Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. H. Hartwigk

Versuche zum Nachweis von Brucellen mit Hilfe Fluoreszierender Antikörper

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christian Staak
Tierarzt aus Brüssel

Berlin 1961
Journal-Nr. 357

1962

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON BRUCELLEN MIT HILFE FLUORESZIERENDER ANTIKÖRPER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Christian Staak
Tierarzt aus Brüssel

Berlin 1961
Journal-Nr. 357

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L.F. Müller

Referent: Prof. Dr. H. Hartwigk

Korreferent: Prof. Dr. Dr. M. Lerche

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.1961
Tag der Promotion: 16. 4.1962

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Schrifttum	3
Eigene Untersuchungen	16
I. Material und Methodik	18
II. Versuchsdurchführung und Ergebnisse	25
A. Versuche zur Verbesserung der spezifischen Färbekraft der Konjugate	25
1. Erhöhung des Farbstoffanteils bei der Konjugation	25
2. Erhöhung des Dioxangehaltes sowie des Dioxan- und Acetongehaltes in der Reaktionslösung bei Konjugationen mit Fluorescein-isocyanat	28
3. Versuch der Konjugation von γ-Globulinen mit Fluorescein-isocyanat in reinem Aceton- bzw. Aceton- und Dioxanmedium	31
B. Versuche zur Verringerung von unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen des Gewebes	32
1. Untersuchung des Phagocytosevorganges in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer	33
2. Prüfung der Primärfluoreszenz	34
3. Färbung der Ausstriche mit Fluorescein-isocyanatkonjugaten	35
4. Versuche, die unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen der Gewebselemente durch Modifikation der Färbetechnik zu vermindern	35
5. Direkte Fluorochromierung der Brucellen und ihr Nachweis im Gewebe	38
Besprechung	45
Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	51

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548014_0050

E i n l e i t u n g

Im Rahmen eines Forschungsvorhabens, das sich mit den infektionsabwehrenden Kräften des Organismus von Tieren befaßt, die eine Immunität gegen die Brucelleninfektion erworben haben, sollten Fragen der Pathogenese bei der experimentellen Brucellose des Meerschweinchens studiert werden. Es war beabsichtigt, den Verbleib der Brucellen im Organismus nach der Infektion und im Verlauf der Erkrankung mit Hilfe der im Jahre 1942 von COONS und Mitarbeitern entwickelten Methode des Antigennachweises mit Hilfe fluoreszierender Antikörper zu verfolgen. COONS gelang es, den Farbstoff Fluoresceinisocyanat an Serumproteine mit Antikörpereigenschaften zu koppeln. Dabei blieb das Antigenbindungsvermögen der Antikörper erhalten, und es wurde möglich, ein Antigen auf dem Wege über den spezifischen Antikörper im Fluoreszenzlicht nachzuweisen.

Die Technik des fluoreszierenden Antikörpers ist vornehmlich in der Virusforschung angewendet worden, da die Viren sich wegen ihrer geringen Größe in der Regel lichtmikroskopisch nicht darstellen lassen. Durch die Verbindung mit dem spezifischen Antikörper heben sie sich jedoch im Fluoreszenzlicht von ihrer Umgebung ab. Aber auch für bakteriologische Untersuchungen scheint das Verfahren Vorteile zu bieten, wenn es auf den Nachweis von einzelnen Keimen und Antigen-Substanzen abgestorbener Erreger ankommt. Darüber hinaus wird diesem Untersuchungsverfahren nachgesagt, daß es ein hohes Maß an Erregerspezifität besitzt, da die Anfärbung nicht auf physikalisch-chemischen Reaktionen, sondern auf den streng artspezifischen Antikörper-Antigen-Reaktionen beruht.

Im Institut durchgeführte orientierende Untersuchungen brucellenhaltiger Gewebsschnitte hatten indes verschiedene methodische Schwierigkeiten erkennen lassen. Sie ergaben

sich einmal bei der Herstellung der Gewebsschnitte, die mit der üblichen Schnittechnik in erforderlicher Qualität nicht hergestellt werden konnten. Zum anderen zeigte es sich, daß die Fluoreszenz der mit den Brucellen verbundenen Antikörper nur gering war und nicht unterschieden werden konnte von unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen mancher Gewebsteile. Es wurde mir daher die Aufgabe gestellt zu prüfen, ob durch Änderung der Präparationsvorschriften fluoreszierende Antikörper mit stärkerer Fluoreszenz gewonnen werden könnten und ob es möglich ist, die unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen von Gewebselementen zu unterdrücken oder von den spezifischen Fluoreszenzerscheinungen zu differenzieren.

Schrifttum

Die Fluoreszenz oder Luminiszenz entsteht, wenn eingestrahltes kurzwelliges Licht in Licht von längerer Wellenlänge umgewandelt wird. Erstmals wurde die Fluoreszenz beim Flußspat beobachtet, sie ist jedoch vornehmlich eine Eigenschaft organischer Substanzen.

STÜBEL (86) untersuchte die Gewebe verschiedener Tierarten, Bakterien und Protozoen im Fluoreszenzlicht von 300 - 400 mμ. Dabei stellte er fest, daß festes und trockenes Gewebe stärker fluoresziert als lockeres und feuchtes und daß Pigmente, Blut und Blutderivate die Fluoreszenz abschwächen.

WELS (97) bestrahlte Serumeuglobuline mit kurzwelligem Licht und erzielte eine der Dauer der Bestrahlung proportionale Steigerung der Fluoreszenz, die eng mit der Anwesenheit von Sauerstoff verknüpft war. Zu dem gleichen Ergebnis kamen WELS und JOKISCH (98, 99) bei der Untersuchung von Froschmuskulatur und den Keimzellen der Pfahlmuscheln. Eine Steigerung der Fluoreszenz konnte auch nach dem Bestrahlen mit Röntgenstrahlen festgestellt werden.

SJÖSTRAND (80) unterschied im tierischen Gewebe zwischen der Grundfluoreszenz des Zytoplasmas und der speziellen Fluoreszenz aufleuchtender Granula. Die Granula zeigten die verschiedensten Formen und bis auf Rot und Violett auch sämtliche Farbabstufungen, ohne daß sich feste Gesetzmäßigkeiten ergaben. Besonders eingehend wurden die Nieren von Mäusen untersucht, und zwar in Abhängigkeit von der Ernährung der Tiere. Nach Steuerung der Nahrungszufuhr konnte die spezielle Fluoreszenz in charakteristischer Weise beeinflußt werden. Sie war eng mit dem Funktionszustand der Zelle verknüpft.

KOSENOW und TREIBS (53) beschrieben eine Rotfluoreszenz von Erythrocyten als Folge einer Porphyrinstoffwechselstörung bei Hydroa aestivale des Menschen. Beim Kaninchen wurden

nach Bleivergiftungen rot fluoreszierende Erythrocyten festgestellt (EMMINGER und BATTISTINI, zitiert nach FELLINGER und PAKESCH (25)).

Gegenstand naturwissenschaftlicher Forschung sind jedoch weniger die nativen Fluoreszenzerscheinungen, die auch als Primär- oder Eigenfluoreszenz bezeichnet werden. Weit größere Bedeutung hat die Sekundärfluoreszenz erlangt, die nicht fluoreszierenden Gewebselementen oder Mikroorganismen durch Anfärbung mit fluoreszierenden Substanzen verliehen werden kann. In manchen Fällen gelingt dies ohne wesentliche Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der zu untersuchenden Gewebe bzw. Organismen.

Das Ziel Mikroorganismen darzustellen, verfolgte als erster HAGEMANN (34). Er benutzte zunächst das Berberinsulfat, um Leprabakterien in Ausstrichen zu färben. Unter Verwendung weiterer Fluorochrome wurde dann diese Methode auf andere Bakterien, auf Pilze und auch auf die Darstellung von Viren ausgedehnt (33).

HAGEMANN (33) sah drei Möglichkeiten zur Fluorochromierung:

1. Die Untersuchung von Gewebsausstrichen nach Anfärbung mit Fluorochromen zum Nachweis von Mikroorganismen.

2. Zusatz von fluoreszierenden Stoffen zu festen oder flüssigen Nährböden, um den darauf wachsenden Mikroorganismen eine Fluoreszenz zu verleihen.

3. Die Darstellung von Mikroorganismen, speziell von Protozoen, in vivo durch Verabreichung von fluoreszierenden Therapeutika an infizierte Tiere.

Die als zweite Möglichkeit angeführte Methode war bereits 1903 von REITZ (74, 75) zum Nachweis der photodynamischen Wirkung verschiedener Substanzen angewendet worden, und das an dritter Stelle erwähnte Verfahren ist von JANCSO (41, 42, 43, 44, 45) sowie von FISCHL und SCHWENK (27) im Zuge von Forschungen über die chemotherapeutische Wirkung verschiedener fluoreszierender Präparate eingeführt worden.

HAGEMANN (35) hat sich vor allem durch die Einführung der Auraminfärbung in die Routinediagnostik der Tuberkulose verdient gemacht. Sie wurde von HERRMANN (39) abgewandelt, dem es gelang, in etwa 90 % der kulturell positiven Sputumproben mikroskopisch fluoreszierende Tb-verdächtige Keime nachzuweisen. Die Färbung nach Ziehl-Neelsen erbrachte nur etwa 35 % positive Ergebnisse. 1952 berichtete HARMS (37) über die Anwendung einer modifizierten Hagemannschen Färbung zum Nachweis von Tuberkelbakterien in der Milch. Der von diesem Autor angegebenen Überlegenheit der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber der Ziehl-Neelsen-Färbung ist widersprochen worden. KLEIN (48) kam häufig zu Fehlergebnissen auf Grund der mangelnden Unterscheidungsmöglichkeit der Tuberkelbakterien von anderen säurefesten Keimen. Er fand daher die Fluoreszenzfärbung zum Nachweis von Tuberkelbakterien in der Milch nicht geeignet.

STRUGGER (81) führte im Jahre 1940 die Anfärbung mit Akridinorange in die Histologie und Bakteriologie ein. Bei Untersuchungen an Pflanzenzellen konnte STRUGGER (82) feststellen, daß das Akridinorange im dissoziierten Zustand im schwach sauren Bereich eine von der Konzentration abhängige Fluoreszenzfarbe aufwies, die von Grün bei niedrigen Konzentrationen über Gelb bis ins leuchtend Rote ging. Lebende Zellen bzw. lebendes Eiweiß vermochten das Akridinorange nur bis zur Grünfärbung, totes dagegen bis zur Rotfärbung zu speichern. Für diese Beobachtung fand STRUGGER (83, 84) folgende Erklärung: Das lebende Protoplasma wird aus einem Netzwerk von Eiweißkörpern aufgebaut, in welchem die elektrostatischen Bindungsmöglichkeiten für die Farbstoffkationen verhältnismäßig gering sind. Nach dem Tode tritt eine starke Unordnung im Eiweiß-Mizellargerüst ein, wodurch die Bindungsmöglichkeiten für den kathodischen Farbstoff erhöht werden. STRUGGER und HILBRICH (85) untersuchten Deckglaspräparate toter und lebender Bakterien und stellten fest, daß bei entsprechend niedriger Konzentration des Farbbades der lebende Keim das Akridinorange nur bis zur Grünfärbung, der tote

dagegen bis zur Rotfärbung zu speichern vermochte. Der Nachweis der Lebensfähigkeit wurde durch kulturelle Untersuchungen und Infektionsversuche erbracht.

Der Ansicht von Strugger über die unterschiedliche Anfärbung von lebendem und totem Protoplasma wurde verschiedentlich widersprochen. BUCHERER (3) machte hierfür die Konzentration des Akridinorange, d.h. das Verhältnis Akridinorange : Bakterien verantwortlich. Er fand, daß tote Keime auch grün und lebende rot gefärbt sein können. MAY (62) sah in der unterschiedlichen Anfärbung vor allem auch die Folge einer Verschiebung des pH-Wertes des Farbbades. FLEGEL (28) fand Differenzen in der Anfärbung von Mikroorganismen, die er auf Arteigentümlichkeiten der Keime zurückführte.

Ein weiteres Anwendungsgebiet fand die Fluorochromierung in der Hämatologie. Da die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen z.T. an Blutausstrichen vorgenommen wurden, sei erwähnt, daß verschiedene Fluorochrome verwendet wurden, wobei das Akridinorange auf Grund seines unterschiedlichen Farbverhaltens eine besondere Rolle spielte (25, 49, 50, 51, 52, 78, 102). Besonders die weißen Blutkörperchen ließen eine starke Affinität zu den Fluorochromen erkennen.

Im letzten Jahrzehnt hat sich der Fluoreszenzmikroskopie ein neues Anwendungsgebiet eröffnet durch die Darstellung von Antigenen mit Hilfe fluoreszierender Antikörper (FA-Technik). Im Prinzip handelt es sich ebenfalls um die Sichtbarmachung von Bakterien oder Virusaggregaten, doch erfolgt sie nicht durch direkte Anfärbung, sondern auf dem Umweg über die spezifischen Antikörper. Infolgedessen erlangt die Fluorochromierung ein hohes Maß an Spezifität und bietet eine Möglichkeit, selektiv die Bakterien oder Viren anzufärben, gegen die die Antikörper gerichtet sind.

Die chemischen Voraussetzungen für die Markierung von Eiweißkörpern mit fluoreszierenden Substanzen wurden mit den Arbeiten von CREECH und JONES (18, 19) sowie von COONS,

CREECH und JONES (14) in den Jahren 1941 und 1942 gelegt. Es gelang diesen Autoren, Isocyanate verschiedener polynukleärer Kohlenwasserstoffe mit Proteinen in einem wäßrigen Dioxanmedium chemisch zu verbinden, ohne daß, wie am Beispiel des Anti-Pneumokokkenserums gezeigt werden konnte, eine stärkere Denaturierung der Eiweißmoleküle und ein Verlust der Antigenspezifität eintrat. Das grün fluoreszierende Fluorescein-isocyanat erwies sich für die Eiweißmarkierung als besonders geeignet. Seine Synthese und die Vorschriften für die Bindung an das Eiweiß, die als Konjugation bezeichnet wurde, sind von COONS und KAPLAN (15) und in Deutschland von POETSCHKE, UEHLECKE und KILLISCH (72) beschrieben worden.

Es lag nahe, diese Methode nicht nur bei der Untersuchung von Gewebsausstrichen anzuwenden, sondern auch auf das Gebiet der Immunhistologie auszudehnen. Eine Voraussetzung hierfür war die eiweißschonende Behandlung der Organe, die in der Regel in unfixiertem Zustand verarbeitet werden mußten. Dies gelang mit Hilfe der von Linderstrøm-Lang und Morgensen eingeführten Gefrierschnittechnik, die von COONS, LEDUC und KAPLAN (17) modifiziert worden war.

Der Nachweis des Antigens kann auf verschiedene Weise geführt werden. In einer Zusammenfassung über die Anwendung der FA-Technik bei Viren und Rickettsien gab LIU (57) folgende Darstellung der drei technischen Möglichkeiten der Färbung des Antigens:

1. Die direkte Färbemethode: Die Serumantikörper werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert und den antigenhaltigen Schnitten oder Ausstrichen zugesetzt. Nach 30 Minuten langer Bebrütung folgt eine Spülung, um das überschüssige Konjugat zu entfernen.

2. Die indirekte Färbemethode, wie sie WELLER und COONS (96) erstmalig durchführten: Zunächst werden die Schnitte oder Ausstriche mit nichtmarkierten antigenspezifischen γ-Globulinen behandelt, die sich mit dem Antigen verbinden. Dann

wird das γ-Globulin sichtbar gemacht durch nachträgliches Zufügen von markierten Anti-γ-Globulinen . Die Methode hat den Vorzug, daß zum Nachweis verschiedener Antigene nur ein Serum konjugiert zu werden braucht.

3. Das Färben des Komplementes: Es stellt dies eine Modifizierung der indirekten Färbemethode dar, die von GOLDWASSER und SHEPARD (30) entwickelt wurde. Nachdem hier das Antigen in Verbindung mit dem Antikörper das Meerschweinchenkomplement gebunden hat, wird dieses durch konjugierte Anti-Meerschweinchenglobuline sichtbar gemacht.

Wie COONS und Mitarbeiter 1955 (16, 60, 100, 101) gezeigt haben, können mit der FA-Technik nicht nur Antigene, sondern auch Antikörper in Geweben nachgewiesen werden. Dies gelang dadurch, daß die Schnitte zunächst mit einer Lösung des Antigens behandelt wurden, das sich mit den im Gewebe vorhandenen Antikörpern verband. Anschließend wurde das Antigen mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt. Auf diese Weise wurden Antikörper beim Kaninchen, die auf eine Injektion von menschlichen γ-Globulinen, Hühnereieralbumin und Diphtherietoxoid mit und ohne Adjuvantien hin gebildet wurden, dargestellt.

Beim Gebrauch der FA-Technik entstehen häufig dadurch Schwierigkeiten, daß sich auch Gewebsteile mit dem Konjugat anfärben, die das gesuchte Antigen nicht enthalten. 1950 und 1951 suchten COONS und Mitarbeiter (12, 13, 17, 40) die Verteilung von Kapselpolysacchariden der Pneumokokken und des Friedländer Bacillus, von Mumpsvirus und Rickettsien sowie von artfremden Eiweißkörpern in den Geweben der Maus nachzuweisen. Die Autoren stellten dabei unspezifische Anfärbungen fest, die sie mit dem Vorhandensein von überschüssigem, nicht an das Eiweiß gebundenen Farbstoff in der Konjugatlösung in Verbindung brachten oder auf das Vorhandensein unspezifischer Antikörper im Konjugat zurückführten. Der nicht gebundene Farbstoff konnte durch wiederholtes Umfällen in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung sowie durch

eine längere Dialyse beseitigt werden. Die Entfernung der unspezifischen Antikörper gelang durch das Schütteln der Konjugate mit lyophilisiertem oder acetongetrocknetem Leberpulver. Die unspezifischen Anfärbungen machten weiterhin umfangreiche Kontrolluntersuchungen notwendig. Im Prinzip wurden von COONS und KAPLAN (15) drei Verfahren postuliert:

1. Spezifische Hemmung der Anfärbung des gesuchten Antigens durch Vorbehandlung der Schnitte mit spezifischen unkonjugierten Antiseren.

2. Spezifische Entfernung der Antikörper aus den Konjugaten nach dem Ausfällen mit dem entsprechenden Antigen. Diese Konjugate dürfen im Gewebe keine Anfärbungen mehr verursachen.

3. Heterologe Konjugate dürfen keine Färbungen hervorrufen.

Die Konjugationen mit Fluorescein-isocyanat bereiten aus chemischen Gründen Schwierigkeiten. Die Isocyanate bzw. Isocyansäureester stellen unstabile Verbindungen dar, die in Gegenwart von Wasser durch Hydrolyse über ein Carbamidsäurederivat in Kohlendioxyd und primäres Amin zerfallen (KLAGES (47)). In einem Aceton-Dioxangemisch ist das Fluorescein-isocyanat stabil, doch wirken Aceton und Dioxan eiweißfällend, wodurch die reaktionsfähige Oberfläche der Serumeiweißmoleküle verringert wird.

Diese Nachteile führten zur Suche nach geeigneteren fluoreszierenden Substanzen.

RIGGS und Mitarbeiter (76) entwickelten 1958 das Fluoresceinisothiocyanat (Zitiert nach TOLLE (90) und RIGGS u. Mitarb. (76)). Die Bindung an das Eiweißmolekül erfolgt hier nicht über die C-N-O-Gruppe wie beim Fluorescein-isocyanat, sondern über die S-C-N-Gruppe. MARSHALL und Mitarbeiter (61) führten vergleichende Untersuchungen mit Fluorescein-isocyanat und Fluorescein-isothiocyanat unter Anwendung verschiedener Konjugationsverfahren durch und kamen zu dem Schluß, daß Fluorescein-isothiocyanat dem Fluorescein-isocyanat auf Grund einfacher Handhabung bei der Konjugation, der Stabilität und dem Grad der Fluoreszenz überlegen war.

Nach vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen fluoreszierenden Substanzen sahen CHADWICK, MC ENTEGART und NAIRN (6) in Rhodamin B 200 die einzige Alternative zum Fluorescein-isocyanat. Die Bindung des RB 200 an das Eiweiß erfolgt über ein Sulfonamidglied. Die entstandenen Konjugate waren stabil und besaßen eine brillante orangefarbene Fluoreszenz, die gegenüber der Primärfluoreszenz der Gewebe gute Kontraste bildete.

1959 wurde von DOWDLE und HANSEN (24) das 2,2',4-trihydroxy-4-aminoazobenzol erwähnt, das in Form des Iso-thiocyanates mit den Eiweißkörpern verbunden wurde. Die Präparate mußten nach der Behandlung mit dem Konjugat erst in einer aluminiumhaltigen Lösung entwickelt werden und zeigten dann eine starke Fluoreszenz.

PETUELY und LINDNER (71) berichteten in ihren Untersuchungen über die Darmflora über das 1-Dimethylamino-5-naphthalinsulfosäurechlorid, das von Mayersbach in die Immunhistologie eingeführt worden war. Sie erzielten mit ihren Konjugaten gute Ergebnisse.

Die nachfolgende Zusammenstellung soll einen kurzen Überblick über die bisher mit der FA-Technik dargestellten Mikroorganismen geben, wobei es sich vornehmlich um Untersuchungen über die Vermehrung der Erreger im Gewebe und über die Pathogenese, speziell der Viruskrankheiten, handelt.

COONS und KAPLAN (15) wiesen das Mumpsvirusantigen beim Affen und WATSON (94, 95) in der Gewebekultur nach. - Das Antigen von Varicella und Herpes zoster wurde von WELLER und COONS (96) mit Hilfe der indirekten Methode dargestellt. - Das Virus der Hundestaupe konnte im Gehirn und im Harnblasensekret (MOULTON (65) sowie MOULTON und BROWN (66)) angefärbt werden. - Nach intranasaler Infektion konnte das Staupeantigen in den cervikalen, mediastinalen und mesenterialen Lymphknoten, in der Milz, in den Kupferschen Sternzellen der Leber und im Blut nachgewiesen werden (LIU und COFFIN (58)). -

Bei Masern wurde mit Hilfe der indirekten FA-Technik das Antigen in den Kernen und im Zytoplasma infizierter Zellen ermittelt, bevor es zur Ausbildung komplementbindender Antikörper kam (COHEN u. Mitarb. (11)). - Influenzavirusantigen konnte sowohl im Zytoplasma wie auch im Zellkern der Epithelzellen des Respirationstraktes beim Frettchen festgestellt werden (LIU (54, 55)). - Eine diagnostische Methode zum Nachweis des Erregers der Influenza des Menschen im Nasenschleim erwies sich als nicht so zuverlässig wie der Hämagglutinationshemmungstest, führte aber schon frühzeitig zu positiven Ergebnissen (LIU (56)). - Die indirekte Methode benutzten DEIBEL und HOTCHIN (23) zur Sichtbarmachung von Influenzavirus in der Gewebekultur. - Gleichfalls mit der indirekten Methode wiesen BUCKLEY, WHITNEY und RAPP (4) Entwicklungsformen des Psittakosevirus in Gewebekulturen nach. Dies gelang allerdings nur bei hohem Antigengehalt. - In Gehirnschnitten künstlich infizierter Mäuse sowie in Schnitten von Gewebekultur menschlicher Karzinomzellen konnte NOYES (67) das menschenpathogene neurotrope Egypt 101 Virus im Zytoplasma der befallenen Zellen darstellen. Weiterhin gelang es NOYES und WATSON (69), das Vakzinevirus im Zytoplasma infizierter menschlicher Gewebekulturen nachzuweisen. - 1957 fanden NOYES und MELLORS (68) den Erreger eines infektiösen Papilloms bei Wild- und Hauskaninchen in den oberen verhornenden Schichten des Papilloms. - 1957 und 1958 erschienen zwei Veröffentlichungen über die Pathogenität des Geflügelpestvirus. BREITENFELD und SCHÄFER (2) konnten zwei verschiedene Antigene, eines im Kerngebiet, das andere diffus im Zytoplasma verteilt, feststellen. FRANKLIN (29) bestätigte das Vorhandensein von zwei verschiedenen Antigenen. Das S-Antigen vermehrte sich im Kern, sofern dieser sich nicht im Stadium der Mitose befand. Das hämagglutinierende Antigen wurde im Zytoplasma gefunden und trat zeitlich nach dem Erscheinen des S-Antigens auf. - In einer vorläufigen Mitteilung (92) wurde der Onkotropismus des West-Nil-Virus untersucht. Die Vermehrung des Antigens fand lediglich in den Zellen, nicht aber in der inter-

zellulären Substanz statt. Die Onkolyse schien auf einer Wirkung des Virus zu beruhen und nicht auf einer Systemreaktion des Körpers, denn die gleichen Prozesse liefen auch in der Gewebekultur ab. - GOLDWASSER und KISSLING (31) untersuchten mit der direkten und der indirekten Methode sowie mit Hilfe der Anfärbung des Komplements Gehirnausstriche von tollwutinfizierten Mäusen. - 1959 berichteten BOYER, DANNY und GINSBERG (1) über Untersuchungen mit der indirekten Methode an HELA-Zellkulturen, die mit Adenovirus Typ 4 infiziert worden waren. Auf Grund von vergleichenden Untersuchungen mit dem Licht- und Phasenkontrastmikroskop konnte festgestellt werden, daß die Produktion von infektiösem Virus an bestimmte Veränderungen des Zellkerns gebunden war. - Das Auftreten von Adenovirus Typ 5 in HELA-Zellkulturen wurde mit der direkten Methode von PEREIRA, ALLISON und BALFOUR (70) untersucht. Das Antigen erschien zunächst als feine Granula in den Zellkernen und füllte diese später als uniforme, hellfluoreszierende Masse an. - TOLLE (90) war mit der indirekten Methode, bei der er mit Fluorescein-isothiocyanat markierte Antikörper verwendete, in der Lage, ein Leukoseagens im Gewebe infizierter Babymäuse nachzuweisen. - 1960 beschrieben TRAVER, NORTHROP und WALKER (91) Untersuchungen an Myxoviren, die sie mit Hilfe von Fluorescein-isothiocyanatkonjugaten durchgeführt hatten. Virusansammlungen in den Zellkernen fanden sich lediglich beim Influenzavirus A, das sich später auch im Zellplasma feststellen ließ. Beim Influenzatyp Sendai, beim Mumpsvirus und dem Virus der Geflügelpest war das Antigen ausschließlich im Zytoplasma verstreut. - SACHS und VOGEL (77) bedienten sich der direkten Methode zum Nachweis von Polyoma-Virusantigen, dessen Gehalt nach Kultivierung der Geschwulstzellen in vitro anstieg. Wurden diese Zellen auf Versuchstiere transplantiert, so trat in den primären Tumoren die spezifische Fluoreszenz auf. Sie war bei Mäusen am stärksten, weniger bei Ratten und am schwächsten bei Hamstern ausgeprägt.

Der Nachweis von bakteriellen Antigenen mit Hilfe der FA-Technik setzte relativ spät ein.

1953 fand SHELDON (79) das Antigen der Leptospira icterohämorrhagiae in Muskelveränderungen erkrankter Menschen. Eine spezifische Anfärbung gelang erst, nachdem durch Schütteln mit Knochenmarkpulver die unspezifischen Antikörper aus dem Konjugat entfernt worden waren. - Die indirekte Färbemethode wendeten DEACON, FALCONE und HARRIS (21) sowie DEACON, FREEMAN und HARRIS (22) an, um Treponema pallidum nachzuweisen. - CARTER und LEISE (5) benutzten gleichfalls die indirekte Methode zur Darstellung von Brucella suis, Pasteurella tularense, Vibrio comma und Pasteurella pestis. - THOMASON, CHERRY und MOODY (89) markierten Serumantikörper gegen das O-, H- und Vi-Antigen von Salmonella typhosa mit Fluorescein-isocyanat. Die Anfärbungen, die auch bei anderen Salmonellatypen durchgeführt wurden, entsprachen weitgehend den Ergebnissen der Probeagglutinationen. - THOMASON, CHERRY und EDWARDS (87) gewannen Anti-Salmonella-O-Seren vom Kaninchen, die sie mit Fluoresceinisocyanat konjugierten, um Salmonellen in Kotausstrichen schnell identifizieren zu können. Die Methode befriedigte jedoch nicht, da die Konjugate auch andere Enterobakterien anfärbten. - Vibrio comma konnte im Kot künstlich infizierter Meerschweinchen nach Anreicherung mit Hilfe von spezifischen, nach der Methode von Marshall hergestellten Konjugaten frühzeitig erkannt werden (FINKELSTEIN und LA BREC (26)).- LA BREC, FORMAL und SCHNEIDER (59) markierten Anti-Shigellaseren mit Fluorescein-isocyanat oder mit Fluorescein-isothiocyanat. Die mit dem letztgenannten Farbstoff hergestellten Präparate waren den Fluorescein-isocyanatkonjugaten überlegen. Die direkte Methode eignete sich gut zum Nachweis von Shigella flexneri. Bei der indirekten Methode war die Spezifität unzureichend, da das markierte Anti-γ-Globulinserum vom Schaf Antikörper gegen verschiedene andere Shigellaarten enthielt. - PETUELY und LINDNER (71) berichteten über gelungene Anfärbungen von pathogenen Colistämmen mit spezifischen Antikörpern, die sie mit 1-Dimethylamino-5-naphthalinsulfosäure-

chlorid markierten. - In zwei Arbeiten beschrieben MOODY, GOLDMAN und THOMASON (63) die spezifische Darstellung von Malleomyces pseudomallei. - 1958 gewannen MOODY, ELLIS und UPDYKE (64) einen markierten Antikörper gegen die Streptokokken der Gruppe A. Trotz der mit dem Praecipitintest nachgewiesenen Gruppenspezifität färbten diese Antikörper Streptokokken der Gruppe C und in geringem Maße auch der Gruppe G an. Erst nach Adsorption mit Erregern der Gruppe C waren die Konjugate gruppenspezifisch. Mit entsprechenden Antikörpern konnten Erreger der Gruppen B, C, D, F und G spezifisch nachgewiesen werden. Einige Stämme der Gruppe B erbrachten trotz positiver Praecipitation keine Anfärbung mit dem gruppenspezifischen Konjugat. - HALPEREN, DONALDSON und SULKIN (36) berichteten gleichfalls von markierten Anti-Streptokokken-A-Seren, die lediglich noch Erreger der Gruppe C anfärbten. Sie benutzten die markierten Antikörper zum Nachweis dieser Streptokokken in Abstrichen aus dem Rachen des Menschen. Auch REDYS, ROSS und BORMAN (73) adsorbierten zunächst Anti-Streptokokken-A-Seren, die sie mit Fluorescein-isothiocyanat markierten, mit Streptokokken der Gruppe C. Die erzielte Fluoreszenz war daraufhin ziemlich schwach. Nach Vorbehandlung der Ausstriche mit Seren gegen Streptokokken der Gruppe C und anschließender Behandlung mit nicht adsorbiertem Konjugat gegen die Gruppe A war die auftretende Fluoreszenz hinsichtlich Leuchtintensität und Spezifität befriedigend. Die Autoren stellten weiterhin fest, daß Koagulase-positive Staphylokokken sich stets mit Konjugaten, deren Antikörper von normalen Kaninchen stammten, anfärbten. - CHARTER (8) verwendete das Fluorescein-isothiocyanat zur Markierung von Seren mit Antikörpern gegen Koagulase-positive Staphylokokken. Er untersuchte Nahrungsmittel, in denen die Staphylokokken noch im toten Zustand spezifisch nachgewiesen werden konnten. - DACRES und GROTH (20) benutzten das Fluorescein-isothiocyanat, um Erysipelothrix rhusiopathiae direkt oder aber mit Hilfe der Anfärbung des Komplements darzustellen. - Bacillus anthracis wurde von CHERRY und FREEMAN (9) mit der direkten und

indirekten Methode angefärbt. Die Autoren untersuchten Ausstriche, Abklatschpräparate und Gewebsschnitte künstlich infizierter Versuchstiere. Sie konnten zeigen, daß sich die FA-Technik auch im Anschluß an die Gram-Färbung durchführen ließ.

Abschließend sollen noch zwei Arbeiten erwähnt werden, die sich mit dem Nachweis von Pilzen befaßten.

GORDON (32) markierte Anti-Candidaglobuline, um bestimmte Hefearten selektiv nachzuweisen. Die Spezifität konnte durch Adsorption der Globuline mit heterologen Candida-Antigenen erhöht werden. - In der zweiten, von VOGEL und PADULA (93) veröffentlichten Arbeit wird der Nachweis von Histoplasma capsulatum, Candida albicans, Blastomyces dermatitidis und Cryptococcus neoformans mit Hilfe der indirekten Methode beschrieben.

Eigene Untersuchungen

Die FA-Technik sollte dazu dienen, durch den Nachweis des Verbleibs der Brucellen im Gewebe die Pathogenese der Brucellose bei empfänglichen und immunisierten Meerschweinchen zu studieren. Orientierende Untersuchungen hatten ergeben, daß mit Konjugaten, die nach den Angaben von CHADWICK, MC ENTEGART und NAIRN (6) mit Rhodamin B 200 hergestellt worden waren, keine ausreichende Anfärbung der Brucellen zu erzielen war. Versuche mit Fluorescein-isocyanatkonjugaten, die in Anlehnung an die Methode von POETSCHKE, UEHLECKE und KILLISCH (72) präpariert wurden, führten zu etwas besseren Ergebnissen.

Um die Fluoreszenzintensität der Konjugate zu verbessern, sollte geprüft werden:

1. Ob das Ausmaß der Farbstoffkonjugation bei der Herstellung von RB 200- und Fluorescein-isocyanatkonjugaten durch Erhöhung der Farbstoffmenge bei der Präparation gesteigert werden kann;

2. Inwieweit die Erhöhung des Dioxangehaltes sowie des Dioxan- und Acetongehaltes in der Reaktionslösung bei der Konjugation mit Fluorescein-isocyanat eine vermehrte Bindung des Farbstoffes an das Eiweißmolekül bewirkte;

3. Ob der Zerfall des Fluorescein-isocyanates in Gegenwart wäßriger Lösungen durch Verwendung eines Dioxan- bzw. Dioxan- und Acetonmediums an Stelle der Reaktionslösung eingeschränkt werden könnte.

Die Qualität der Konjugate wurde durch Zugabe von agglutinierenden Brucellenantigenen zu den Konjugaten, kurzzeitige Bebrütung und anschließende Untersuchung der Brucellen ermittelt. Der denaturierende Einfluß des Präparationsvorganges auf das Antikörpereiweiß wurde durch Bestimmung des Agglutinationstiters der Konjugate und der bei der Herstellung anfallenden Zwischenprodukte kontrolliert.

Unspezifische Fluoreszenzerscheinungen von Gewebselementen, die bei der Untersuchung brucellenhaltiger Blutausstriche von Meerschweinchen mittels der FA-Technik beobachtet wurden und die Erkennung der Brucellen erschwerten, sollten auf ihre Herkunft überprüft und nach Möglichkeit ausgeschaltet werden.

Zu diesem Zweck wurden untersucht:

1. Der Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf die Primärfluoreszenz;

2. Ob die Anfärbung der Gewebselemente durch den freien Farbstoff der Konjugate durch eine Vorbehandlung der Präparate mit Farbstoffen anderer Farbqualität vermindert werden kann.

Diese Versuche wurden an Ausstrichen von Meerschweinchenzitratblut durchgeführt, denen Brucellen zugefügt worden waren.

Abschließend wurde eine Versuchsreihe angesetzt, bei der die Brucellen durch Züchtung auf farbstoffhaltigen Nährböden fluorochromiert wurden. Die fluorochromierten Brucellen sollten zur Infektion benutzt und durch ihre Fluoreszenz im Gewebe erkennbar werden. Durch Aufbewahrung und wiederholte Waschungen und durch Zugabe der Brucellen zum Meerschweinchenzitratblut wurden Stärke und Dauer der Farbstoffverankerung überprüft.

I. Material und Methodik

1. Optische Ausrüstung:
Große Fluoreszenzeinrichtung der Fa. Carl Zeiss. Als Strahlenquelle diente eine Quecksilberbogenlampe (HBO 200 von OSRAM), deren spektrale Emission durch einen starken Anteil an ultravioletten und blauvioletten Strahlen ausgezeichnet ist. Die ausgesandten Strahlen passieren ein Wärmeschutzfilter und die Erregerfilter. Das Licht gelangt dann über einen fest justierten oberflächenbelegten Aluminiumspiegel in das Mikroskop. Der Kondensor besitzt eine numerische Apertur von 1,3 bei Ölimmersion. Als Mikroskop diente der Typ STANDARD GF 525 der Fa. Carl Zeiss. An Objektiven wurden verwendet: Achromat 10/0,25 Ph, Achromat 40/0,65 Ph, Achromat 100/1,30 Ph sowie die Neofluare 63/0,90 und 100/1,30 Ph. Die Sperrfilter sind auf zwei Drehscheiben in einem Zwischentubus angebracht. Im allgemeinen wurden als Erregerlichtfilter die Typen BG 12,3 mm, und BG 12, 4 mm dick, zusammen verwendet. Die spektrale Transmission dieser Filter liegt in einem Wellenbereich von 5500 - 8000 Å. Damit wurde eine intensive Blau-Violett-Anregung erzielt. Als Sperrfilterkombination wurde in der Regel in der oberen Filterscheibe der Filter OG 4 als Sperrfilter für Blau und in der unteren der Filter GG 4 als Sperrfilter für UV-Strahlen gewählt.

2. Farbstoffe für die Konjugation:
   a) Lissamin Rhodamin B 200 (RB 200) der "Imperial Chemical Industries Limited", Manchester, England.
   b) Fluorescein-isocyanat. Dieser Farbstoff wurde vom Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin hergestellt. 6 g dieser Substanz lagen in einer Mischung von 120 ml Aceton und 60 ml Dioxan in stabiler Form vor.

3. Antibrucellaseren:
   a) Serum eines brucelloseinfizierten Rindes mit einem Agglutinationstiter von 1:2560.

b) Kaninchenseren, die folgendermaßen gewonnen wurden: Kaninchen wurden mit 0,5 ml einer Schrägagarabschwemmung von lebenden Keimen der Brucella abortus Stamm 19 intravenös infiziert. Die Dichte der Abschwemmung entsprach dem Bariumsulfatvergleichsröhrchen III. Dieser Injektion folgte nach einer Woche eine zweite mit der gleichen Menge und, wenn nötig, in wöchentlichen Abständen weitere mit 1,0 ml. Gewöhnlich reichte die 2-3malige Verabreichung von Brucellen aus, um einen Agglutinationstiter von 1:1280 bis 1:10240 zu erzielen. Anschließend wurden die Tiere entblutet und das Serum lyophilisiert.

4. Bestimmung des Eiweißgehaltes:
Die Eiweißbestimmung der Seren und der γ-Globulinlösungen erfolgte nach der Biuretmethode. Die Extinktion der Eiweiß enthaltenden Lösung gegenüber einer Leerprobe wurde photometrisch mit dem Photometer "Eppendorf" der Fa. Netheler & Hinz, Hamburg, bestimmt.

5. Elektrophorese:
Als Gleichrichter diente das Gerät KA-EM 230 der Fa. Marggraf, Berlin, als Streifenmaterial das Filterpapier Nr. 214 der Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren. Die Streifen wurden in hängender Anordnung in den feuchten Kammern angebracht. 2 cm unterhalb des Scheitelpunktes der Streifen auf der Seite der Anode lagen die Auftragungsstellen für das Untersuchungsmaterial. Als Puffer wurde Veronal-Na + Na-acetat-Puffer (Ionenstärke μ = 0,1, pH 8,6) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 9 mA 7 Stunden lang durchgeführt. Anschließend kamen die Streifen zur Trocknung und Fixierung 20 - 30 Minuten in einen Trockensterilisator von 100° C. Für die Färbung der Streifen wurde Azokarmin verwendet. Die Auswertung der Streifen erfolgte im Elphor-Integraphen der Fa. Bender & Hobein, München.

6. Konjugationen mit Rhodamin B 200:
Der Farbstoff lag in Pulverform vor und mußte für die Konjugation erst vorbereitet werden. Dazu wurden 1 g RB 200

mit 2 g PCl_5 in einem Mörser unter dem Abzug miteinander verrieben. Nach dem Mischen wurden 10 ml wasserfreies Aceton zugegeben, gerührt und filtriert. Der Farbton der fertigen Farblösung sollte einer 1 %igen $KMnO_4$-Lösung entsprechen. Vor der Konjugation wurde ein Teil Serum mit einem Teil physiologischer NaCl und einem Teil Karbonat-Bikarbonat-Puffer (pH 9; 0,5 M) gemischt. Der in Aceton gelöste Farbstoff wurde in einer Menge von 0,1 ml/ml Serum tropfenweise und unter Rühren in einem Zeitraum von 15 Minuten der Mischung zugegeben. Der pH-Wert der Mischung mußte über 7 bleiben. Nach weiterem Rühren über 15 Minuten war die Konjugation beendet. - Wurde mehr Farbstoff zugegeben, so wurde die Zeit der Konjugation entsprechend verlängert.

Zur Entfernung des freien und des vom Eiweißkörper adsorbierten Farbstoffes wurde das Konjugat mit Aktivkohlepulver eine Stunde lang geschüttelt (0,05 g Kohle/ml Serum) und abzentrifugiert. Um unspezifische Antikörper zu entfernen, wurde das Konjugat mit Leberpulver (0,1 g/ml Serum) der DIFCO LABORATORIES DETROIT, Michigan, eine Stunde geschüttelt und anschließend klar zentrifugiert. Abschließend wurden durch Ausfällen der γ-Globuline in 40 - 45 %iger Ammoniumsulfatkonzentration und Aufnahme des Bodensatzes in einer Menge physiologischer NaCl, die ungefähr der halben Serumausgangsmenge entsprach, die Antikörper angereichert. Zur Entfernung des Ammoniumsulfates wurde das Konjugat gegen physiologische NaCl dialysiert, bis mit $BaCl_2$ kein Sulfat nachweisbar war.

7a) Konjugationen mit Fluorescein-isocyanat:
Nach der Bestimmung des Eiweißgehaltes wurden die γ-Globuline in 40 %iger Ammoniumsulfatkonzentration ausgefällt. Der Ausfällung folgte die Aufnahme des Bodensatzes in gepufferter isotonischer NaCl (GIN = 0,9 %ige NaCl und 0,01 % Na_2HPO_4) mit anschließender Dialyse gegen die gleiche Lösung. Nach Feststellung der Sulfatfreiheit mit $BaCl_2$ wurde der Eiweißgehalt der γ-Globulinlösung bestimmt. Die Lösung der

γ-Globuline wurde unter ständigem Rühren bei einer Temperatur von 0 - 2° C tropfenweise zu einer Reaktionslösung gegeben, die sich nach den Angaben von POETSCHKE, UEHLECKE und KILLISCH (72) aus folgenden Substanzen zusammensetzt:

21,0 ml NaCl (0,15 M)
6,0 ml CO_2/HCO_3-Puffer (pH 9; 0,5 M)
4,2 ml Dioxan
0,4 ml Aceton (über $CaSO_4$ getrocknet)

Das Verhältnis Eiweißlösung : Reaktionslösung betrug 1:4. Pro mg Eiweiß wurden 0,05 mg Fluorescein-isocyanat berechnet. Die entsprechende Menge des Farbstoffes wurde unter Rühren bei einer Temperatur von 0 - 2° C tropfenweise in einem Zeitraum von 30 Minuten zur proteinhaltigen Reaktionslösung zugegeben. Bei Erhöhung des Farbstoffgehaltes wurde die Zeit der Konjugation entsprechend der Mehrzugabe an Fluorescein-isocyanat verlängert. Über Nacht wurde in der Kälte weitergerührt.

Nach der Markierung der γ-Globuline wurden diese nochmals in 40 %iger Ammoniumsulfatkonzentration ausgefällt. Der gelbliche Bodensatz wurde in einer ungefähr der Hälfte der Serumausgangsmenge entsprechenden Menge GIN aufgenommen und in der Kälte gegen die gleiche Lösung dialysiert. Der Nachweis der Sulfatfreiheit wurde mit $BaCl_2$ geführt. - Zur Entfernung des nicht chemisch gebundenen Farbstoffes sowie der unspezifischen Antikörper wurden die Konjugate wie bei der Konjugation mit RB 200 nacheinander mit Kohlepulver und mit Leberpulver geschüttelt.

Die Temperatur bei den Behandlungen der markierten Eiweißkörper betrug 0 - 2° C. Der pH-Wert, der über 7 bleiben sollte, und der Agglutinationstiter wurden ständig überprüft.

b) Konjugationsversuch im Aceton- bzw. Aceton- und Dioxanmedium:

α. Gewinnung von γ-Globulinen durch Acetonfällung:
Durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat gewonnene γ-Globulinlösungen von infizierten Kaninchen wurden mit der

fünffachen Menge tiefgekühlten Acetons (-20° C) vermischt. Nach 1 Minute wurden die ausgefallenen Eiweißkörper abzentrifugiert. Der Bodensatz wurde in derjenigen Menge physiologischer NaCl aufgenommen, die der Menge der Eiweißlösung vor der Ausfällung entsprach. Es folgte die Dialyse. Die Temperatur bei diesen Behandlungen betrug -6 bis +1° C.

ß. Versuch der Koppelung von Fluorescein-isocyanat an Aceton-gefälltes γ-Globulin im Aceton- bzw. Aceton-Dioxanmedium: Mit Aceton aus den γ-Globulinlösungen vom Serum infizierter Kaninchen ausgefälltes γ-Globulin wurde nach dem Abgießen des Acetons mit Fluorescein-isocyanat-haltigem Aceton (40 ml : 10 ml der Ausgangsmenge der Eiweißlösung) oder Aceton-Dioxangemisch (40 ml : 10 ml der Ausgangsmenge der Eiweißlösung) versetzt. Diese Lösungen hatten eine Temperatur von -20° C. Fluorescein-isocyanat war in ihnen in einer Menge von 0,1 mg/mg Eiweiß enthalten. In dem Gemisch betrug das Verhältnis Aceton : Dioxan 3:1. Die Zugabe erfolgte unter Rühren, das 5 Minuten lang fortgesetzt wurde. Danach wurde das Eiweiß abzentrifugiert und in einer der Ausgangsmenge der Eiweißlösung entsprechenden Menge GIN aufgenommen und dialysiert. Sämtliche Behandlungen wurden bei -2 bis +2° C durchgeführt.

c) Orientierende fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Konjugate:
Die Konjugate wurden mit einer Abschwemmung von Brucella abortus Stamm 19, die auf die Dichte des Bariumsulfatröhrchens III eingestellt worden war, zu gleichen Teilen versetzt und eine Stunde bei 37° C bebrütet. Danach wurden die Brucellen abzentrifugiert und in physiologischer NaCl gewaschen. Ein Tropfen des aufgewirbelten Bodensatzes wurde auf den Objektträger gebracht, mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

8. Untersuchung von in vitro infiziertem Meerschweinchenblut mit fluoreszierenden Antikörpern:

a) Gewinnung infizierter Blutausstriche:
Meerschweinchen wurden mit einer Schrägagarabschwemmung von Brucella abortus Stamm 19 Dichte III intraperitoneal infiziert. Vom 10. Tag p.i. ab wurden die Tiere als Blutspender verwendet. Die Leukocyten ließen eine gesteigerte Phagocytose erkennen. - Das Blut wurde durch Herzpunktion entnommen, wobei 1 ml Blut mit 0,05 ml 16 %igem Na-Citrat vermischt wurde. Anschließend wurde das Zitratblut mit einer dichten Brucellenabschwemmung im Verhältnis 1:1 versetzt und bei 37° C bebrütet. Nach unterschiedlichen Bebrütungszeiten wurden Ausstriche angefertigt.

b) Behandlung der Ausstriche mit dem Konjugat:
Die Ausstriche wurden 10 Minuten lang in Aceton fixiert, danach mit dem Konjugat bedeckt und in einer feuchten Kammer 30 Minuten lang bebrütet. Nach der Bebrütung kamen die Ausstriche in ein Bad mit GIN, in dem sie vorsichtig bewegt wurden. - Zum Mikroskopieren wurden die Ausstriche mit einer Mischung aus 9 Teilen Glycerin und 1 Teil NaCl bestrichen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Kontrolluntersuchungen wurden sowohl mit Blut nicht vorbehandelter Meerschweinchen, als auch mit Blutproben, denen statt Brucellen NaCl zugegeben worden war, durchgeführt.

c) Kontrollfärbungen mit Toluidinblau:
Die Ausstriche wurden 2 Minuten lang in Chloroform fixiert und anschließend 1 Minute mit einer Toluidinblaufarblösung gefärbt (Toluidinblau 0,5 g; Äthylalkohol 95 % 10 ml; Phenol 3 ml; aqua dest. ad 100 ml), abgespült mit Leitungswasser und zwischen Fließpapier getrocknet.

9. Anwendung verschiedener Fixierungsmittel:
Als Fixierungsmittel wurden angewendet: Aceton, Äthanol, Chloroform und Bouinsche Lösung (20 ml wäßrig gesättigte Pikrinsäure, 10 ml Formalin 40 %ig, 1 ml Eisessig). Die Dauer der Fixierung betrug bei Aceton, Äthanol und Chloroform 10, 30 und 90 Minuten, bei Bouinscher Lösung 30 und 180 Minuten.

10. Vorbehandlung der Ausstriche mit Farbstoffen vor der Färbung mit dem Konjugat:
An Farbstoffen wurden verwendet: Phenolphthalein, Methylenblau, Akridinorange, Rhodamin B 200, Toluidinblau, Neutralrot und Phloxin.

Im Prinzip wurden die Färbungen folgendermaßen durchgeführt:

1. Fixieren in Aceton.
2. Einlegen in eine der oben angeführten Farbstoffe, die entweder in Wasser oder in Aceton 1:10, 1:100 oder 1:1000 gelöst worden waren. Beim Färben mit Aceton-gelösten Farbstoffen wurde nicht vorfixiert.
3. Entfärben in Aceton oder Wasser.
4. Nachfärbung mit Fluorescein-isocyanat, das in Aceton im Verhältnis 1:25 gelöst war oder mit dem Konjugat.

11. Untersuchungen mit fluorochromierten Brucellen:
Fluorochromierung der Brucellen:
An Farbstoffen wurden verwendet: Fluorescein-isocyanat, RB 200, Phloxin und Akridinorange.

Die letzten drei Substanzen wurden in einer Konzentration von 1:100, 1:1000 und 1:10000 und das Fluorescein-isocyanat, das in einem Aceton-Dioxangemisch vorlag, in einer Menge von 2,0/25 ml, 0,2/25 ml und 0,02/25 ml dem verflüssigten Albiminährboden zugegeben. Die Nährböden wurden im Dampftopf sterilisiert, in Reagenzröhrchen abgefüllt und schräg erstarren gelassen. Bei Akridinorange 1:100 und in geringem Maße auch noch bei 1:1000 blieb ein Teil des Farbstoffes ungelöst. Nach einer Sterilitätskontrolle durch Bebrüten der Röhrchen wurden sie beimpft und bebrütet. Nach 5 bis 6-tägiger Bebrütung wurden die Keime mit physiologischer NaCl abgeschwemmt, bei 10.000 UpM abzentrifugiert und nach dem Dekantieren des Überstandes in der der Ausgangsmenge der Suspension entsprechenden Menge NaCl aufgenommen.

II. Versuchsdurchführung und Ergebnisse

A. Versuche zur Verbesserung der spezifischen Färbekraft der Konjugate

1. Erhöhung des Farbstoffanteils bei der Konjugation

a) Konjugationen mit RB 200

Eine erste orientierende Versuchsreihe wurde mit normalem Rinderserum durchgeführt. Beginnend mit 0,025 ml Farbstoff/ml Serum wurde die Farbstoffmenge um je 0,025 ml/ml Serum gesteigert bis zu 2,0 ml Farbstoff/ml Serum. Es entstanden acht verschiedene Konjugate. Die Konjugate wurden vor und nach der Behandlung mit Aktivkohlepulver papierelektrophoretisch aufgetrennt und die Papierstreifen photometrisch im Elphor-Integraphen ausgewertet. Aus der Gesamtextinktion und der Extinktion der einzelnen Fraktionen vor und nach der Kohlebehandlung konnte ein Überblick über die Farbstoffbindung an das Serumeiweiß gewonnen werden.

In allen Konjugaten ließ sich vor dem Schütteln mit Kohle im Bereich der α-Globuline ein hellroter Farbstreifen nachweisen, dessen Farbintensität sich parallel zur zugegebenen Farbstoffmenge erhöhte. Diese Fraktion fehlte nach dem Schütteln mit Kohlepulver. Sie bestand demnach aus freiem, nicht an das Serumeiweiß gebundenen Farbstoff. Auch die Farbintensität der Albumine und der Globulinfraktionen hatte sich nach der Kohlebehandlung verringert. Dies wurde als Zeichen dafür angesehen, daß das Eiweiß einen Teil des Farbstoffes nicht chemisch gebunden, sondern lediglich adsorbiert hatte. Der adsorbierte Farbstoff war durch das Schütteln mit Aktivkohle wieder entfernt worden. Sowohl vor als auch nach der Kohlebehandlung war ein Parallelgehen der Extinktionsstärke der Eiweißfraktionen mit der bei der Konjugation verwendeten Farbstoffmenge festzustellen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Kaninchenserum mit einem Brucella-Agglutinationstiter von 1:5120 mit 0,1 ml

Farbstoff (a), 0,15 ml Farbstoff (b) oder 0,2 ml Farbstoff/ml Serum (c) konjugiert. Tabelle 1 gibt den Abfall der Agglutinationstiter während des Konjugations- und Reinigungsprozesses wieder und zeigt, daß das Antigenbindungsvermögen der Antikörper sich durch den Konjugationsprozeß etwa um die Hälfte verminderte. Die zugegebene Farbstoffmenge beeinflußte den Vorgang der Denaturierung offenbar nicht. Mit keinem der Konjugate konnte eine befriedigende Fluoreszenz der Brucellen erreicht werden. Große Bakterienanhäufungen zeichneten sich durch eine orangerote Fluoreszenz aus, einzeln liegende Brucellen fluoreszierten nicht.

Tab. 1: Abfall der Agglutinationstiter im Verlaufe der Konjugation mit unterschiedlichen Mengen von RB 200

Art der Substanz		Menge	Titer	Titerabfall
1. Ausgangsserum		5 ml	5120	-
2. Serum + Puffer + NaCl	a.	15 ml	2560	-
	b.	15 ml	2560	-
	c.	15 ml	2560	-
3. Nach der Konjugation	a.	12 ml	1280	1 Stufe
	b.	12 ml	1280	1 Stufe
	c.	12 ml	1280	1 Stufe
4. Nach d.Schütteln m.Kohle	a.	12 ml	1280	-
	b.	12 ml	1280	-
	c.	12 ml	1280	-
5. Nach der Dialyse	a.	6,5ml	2560	-
	b.	7,0ml	2560	-
	c.	7,0ml	2560	-

b) Konjugationen mit Fluorescein-isocyanat

Es wurde Kaninchenserum mit einem Agglutinationstiter von 1:5120 verwendet. Der Eiweißgehalt betrug 7,47 g%. Je 10 ml der aus diesem Serum gewonnenen γ-Globulinlösung

wurden mit folgenden Mengen Fluorescein-isocyanat konjugiert:

a. 0,05 mg Fluor.-isocyanat/mg Eiweiß
b. 0,075 mg " " / " "
c. 0,10 mg " " / " "

Die Agglutinationstiter zeigten im Verlauf der Konjugation und Reinigung einen Abfall, der in der Tabelle 2 dargestellt ist.

Tab. 2: Abfall der Agglutinationstiter im Verlaufe der Konjugation mit unterschiedlichen Mengen von Fluorescein-isocyanat

Art der Substanz		Menge	Titer	Titerabfall
1. Ausgangsserum		10 ml	5120	-
2. γ-Globulinlösg.		10 ml	5120	-
3. γ-Globulinlösg. + Reakt.lösg.	a.	50 ml	1280	-
	b.	50 ml	1280	-
	c.	50 ml	1280	-
4. Nach der Konjugation	a.	50 ml	640	1 Stufe
	b.	50 ml	640	1 Stufe
	c.	50 ml	640	1 Stufe
5. Nach der 2. Fällung	a.	6,0ml	1280	2 Stufen
	b.	6,8ml	1280	2 Stufen
	c.	7,3ml	1280	2 Stufen
6. Nach d.Schütteln m.Kohle	a.	5,5ml	1280	-
	b.	6,0ml	1280	-
	c.	6,5ml	1280	-
7. Nach d.Schütteln m.Leberp.	a.	4,5ml	640	1 Stufe
	b.	5,5ml	640	1 Stufe
	c.	6,5ml	640	1 Stufe

Es trat im Verlauf der Konjugation und Reinigung ein Titerabfall von 4 Stufen auf, wobei die zugegebene Farbstoffmenge keine Rolle spielte.

Die in der Tabelle 2 mit Nr. 5 bis 7 bezeichneten Präparate wurden auf ihre fluoreszenzmikroskopische Färbungskraft von Brucellen untersucht: Nach Anfärben mit den Konjugaten der Reihe 5 fluoreszierten die Brucellen kräftiger als nach der Behandlung mit Konjugaten der Reihe 6, und diese färbten wiederum mit stärkerer Fluoreszenz als die Endprodukte. Die bei der Konjugation verwendete Farbstoffmenge hatte keinen Einfluß auf die Leuchtkraft der angefärbten Keime.

2. Erhöhung des Dioxangehaltes sowie des Dioxan- und Acetongehaltes in der Reaktionslösung bei Konjugationen mit Fluorescein-isocyanat

Nach den Angaben von CREECH und JONES (18,19) ist die Bindung des Fluorescein-isocyanates an das Eiweiß von dem Dioxangehalt in der Reaktionslösung abhängig. Eine Erhöhung des 15 %igen Anteils um weitere 15 % soll die Farbstoffbindung um das Zwei- bis Dreifache vermehren.

Es wurden 2 lyophilisierte Kaninchenseren mit einem Agglutinationstiter von 1:5120 bzw. 1:2560 und einem Eiweißgehalt von 5,46 bzw. 5,18 g% verwendet. Für das erste Serum betrug der Eiweißgehalt der ausgefällten und in der der Serumausgangsmenge entsprechenden Menge NaCl aufgenommenen γ-Globuline 1,19 g%, für das zweite 1,30 g%.

Bei Verwendung von 10 ml Eiweißlösung für die Konjugation setzten sich die vier Reaktionslösungen folgendermaßen zusammen:

a.			b.		
22,0 ml	NaCl	= 44 %	16,0 ml	NaCl	= 32 %
10,0 ml	Puffer	= 20 %	13,5 ml	Puffer	= 27 %
7,5 ml	Dioxan	= 15 %	10,0 ml	Dioxan	= 20 %
0,5 ml	Aceton	= 1 %	0,5 ml	Aceton	= 1 %
10,0 ml	EW-Lösg.	= 20 %	10,0 ml	EW-Lösg.	= 20 %

c.	16,9 ml NaCl	= 33,9 %	d.	11,9 ml NaCl	= 23,8 %
	10,1 ml Puffer	= 20,1 %		12,6 ml Puffer	= 25,1 %
	12,5 ml Dioxan	= 25,0 %		15,0 ml Dioxan	= 30,0 %
	0,5 ml Aceton	= 1,0 %		0,5 ml Aceton	= 1,0 %
	10,0 ml EW-Lösg.	= 20,0 %		10,0 ml EW-Lösg.	= 20,0 %

Die Verminderung der Antigenbindungsfähigkeit der Antikörper im Verlauf der Präparation ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Abfall der Agglutinationstiter im Verlaufe der Konjugation mit Fluorescein-isocyanat bei Verwendung von Reaktionslösungen mit gesteigertem Dioxangehalt

Art der Substanz		Menge	Titer	Titerabfall
1. Ausgangsserum	a.	5 ml	5120	-
	b.	5 ml	5120	-
	c.	6 ml	2560	-
	d.	6 ml	2560	-
2. γ-Globuline	a.	5,5ml	5120	-
	b.	5,5ml	5120	-
	c.	5,8ml	2560	-
	d.	5,8ml	2560	-
3. γ-Globuline + Reakt.lösg.	a.	25 ml	640	weniger als 1 Stufe
	b.	25 ml	320	mehr als 1 Stufe
	c.	25 ml	640	-
	d.	25 ml	40	4 Stufen
4. Nach der Konjugation	a.	24 ml	320	1 Stufe
	b.	23 ml	320	1 Stufe
	c.	25 ml	320	1 Stufe
	d.	25 ml	20	1 Stufe
5. Nach der 2. Fällung	a.	2,7ml	2560	-
	b.	2,7ml	2560	-
	c.	4,8ml	2560	-
	d.	6,0ml	10	3 Stufen
6. Nach d.Schütteln m.Kohle	a.	1,5ml	1280	1 Stufe
	b.	2,0ml	1280	1 Stufe
	c.	4,5ml	2560	-
	d.	-	-	-
7. Nach d.Schütteln m.Leberp.	a.	0,5ml	1280	-
	b+)	1,0ml	1280	-
	c+)	-	-	-
	d+)	-	-	-

+) Die Konjugate wurden nicht mit Leberpulver geschüttelt.

Der Titerverlust der γ-Globuline nach Zugabe zur Reaktionslösung d. ging einher mit der Bildung eines starken flockigen Bodensatzes. Dies war nach den Angaben von CREECH und JONES (18, 19) zu erwarten, doch hatten die Autoren berichtet, daß sich der Bodensatz bei weiterer Zugabe von Dioxan wieder löste. Die Dioxanmenge wurde deswegen schrittweise jeweils um 3 % bis auf 42 % in der Reaktionslösung gesteigert, jedoch ging der Bodensatz nicht wieder in Lösung. Daraufhin wurde das gesamte Konjugat mit Ammoniumsulfat gefällt und eine Wiederaufnahme in GIN versucht, die jedoch nicht gelang. Der Bodensatz blieb auch nach der Dialyse bestehen. Die Prüfung des klaren Überstandes auf Agglutinine und Eiweiß verlief negativ. Das mit der Reaktionslösung d. hergestellte Konjugat war somit unbrauchbar.

Mit den übrigen Konjugaten wurden Brucellen angefärbt und die erzeugte Fluoreszenzstärke verglichen. Diese Prüfung der Konjugate erfolgte vor und nach dem Schütteln mit Kohle. Vor der Kohlebehandlung ergab das Konjugat b. eine bessere Fluoreszenz als die Konjugate a. und c. Nach der Kohlebehandlung war eine erhebliche Verminderung der Fluoreszenz der Brucellen festzustellen, von der besonders das Konjugat b. betroffen war. Wesentliche Unterschiede zwischen den drei Präparaten bestanden nicht mehr. Die vor der Kohlebehandlung festgestellte bessere Fluoreszenz des Konjugates b. beruhte demnach offenbar lediglich auf einer Erhöhung des an das Eiweiß adsorbierten Farbstoffes.

In zwei weiteren Präparationsgängen wurde außer dem Dioxananteil auch die Acetonmenge in der Reaktionslösung erhöht. Der Dioxangehalt der Reaktionslösung wurde auf 17,5 % bzw. 22,5 % festgesetzt, da der optimale Dioxangehalt nach dem Ergebnis des vorangegangenen Versuches zwischen 15 % und 25 % liegen mußte. Der Acetongehalt wurde auf 7 %, der von COONS und KAPLAN (15) für ihre Reaktionslösungen angegebenen Menge, gesteigert.

Die beiden Reaktionslösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

e.	13,0 ml NaCl	= 26,0 %	
	14,75ml Puffer	= 29,5 %	
	8,75ml Dioxan	= 17,5 %	
	3,5 ml Aceton	= 7,0 %	
	10,0 ml EW-Lösg.	= 20,0 %	
f.	8,0 ml NaCl	= 16,0 %	
	17,25ml Puffer	= 34,5 %	
	11,25ml Dioxan	= 22,5 %	
	3,5 ml Aceton	= 7,0 %	
	10,0 ml EW-Lösg.	= 20,0 %	

Die mit diesen Reaktionslösungen hergestellten Konjugate färbten die Brucellen nicht stärker an als dasjenige Konjugat, das mit einer Reaktionslösung von 20 % Dioxan und 1 % Aceton hergestellt worden war.

3. Versuch der Konjugation von γ-Globulinen mit Fluoresceinisocyanat in reinem Aceton- bzw. Aceton- und Dioxanmedium

Dieser Versuch wurde vorgenommen, da in wäßrigen Reaktionslösungen mit einem Zerfall des in Wasser nicht stabilen Fluorescein-isocyanates zu rechnen war. Wegen der eiweißfällenden Wirkung des Acetons war zunächst zu prüfen, ob die Antikörpereigenschaften der γ-Globuline nach Acetonbehandlung erhalten bleiben.

Vier Lösungen von Brucella-spezifischen γ-Globulinen wurden nach Bestimmung des Eiweißgehaltes und der Agglutinationstiter in der im methodischen Teil beschriebenen Weise mit Aceton behandelt. Nach Wiederaufnahme des Bodensatzes in physiologischer NaCl und Dialyse wurden der Eiweißgehalt und der Agglutinationstiter erneut bestimmt (Tab. 4).

Tab. 4: Darstellung des Eiweißverlustes und des Agglutinationstiterabfalles nach dem Ausfällen der Eiweißkörper aus einer γ-Globulinlösung mit Aceton

γ-Globuline vor der Behandlung m.Aceton			γ-Globuline nach der Behandlung mit Aceton			
Nr.	EW-Geh.	Titer	EW-Geh.	Verlust	Titer	Titerabfall
1.	2,57 g%	2560	1,22 g%	45,3 %	1280	1 Stufe
2.	2,1 g%	5120	1,29 g%	38,6 %	1280	2 Stufen
3.	2,06 g%	1280	1,21 g%	41,3 %	360-640	1-2 Stufen
4.	1,55 g%	1280	0,98 g%	36,8 %	640	1 Stufe

Da mehr als ein Drittel des Eiweißes bei der Acetonzugabe in Lösung blieb, ist die Verminderung des Agglutinationstiters des ausgefällten Eiweißes nach Wiederaufnahme in physiologischer NaCl um 1-2 Stufen nicht erheblich. Eine merkliche Zerstörung der spezifischen Antikörpereigenschaften des γ-Globulins durch die Acetonausfällung konnte demnach ausgeschlossen werden.

Daraufhin wurde die Koppelung des Fluorescein-isocyanates an das γ-Globulin in reinem Acetonmedium oder Aceton-Dioxangemisch in der auf Seite 22 angegebenen Weise mit jeweils einer γ-Globulinlösung aus einem spezifischen Brucellen-Kaninchenserum versucht. Die Konjugate färbten Brucellen nur sehr wenig an. Eine Verbindung von Fluorescein-isocyanat und Antikörpereiweiß war demnach nicht eingetreten.

B. Versuche zur Verringerung von unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen des Gewebes

Bei der Anfärbung von brucellenhaltigen Gewebsschnitten mit Konjugaten hatten sich unspezifische Fluoreszenzerscheinungen von Gewebselementen störend bemerkbar gemacht. Es war nicht möglich, die Brucellen von ihnen zu unterscheiden. Dies gelang um so weniger, als die Fluoreszenz der Keime

nur gering war und die Versuche, durch Änderung der Präparationstechnik Konjugate zu gewinnen, die den Brucellen eine kräftige Fluoreszenz verliehen, nicht zum Erfolg geführt hatten. Deshalb sollte geprüft werden, wieweit es möglich ist, das Auftreten der unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen des Gewebes zu verhindern. Wir führten die Versuche an Ausstrichen von Zitratblut durch, nachdem wir festgestellt hatten, daß auch in mit Konjugat behandelten Blutausstrichen erhebliche unspezifische Fluoreszenzerscheinungen auftraten. Dieses Vorgehen hatte außerdem den Vorzug, daß das Blut mit beliebigen Brucellenmengen versetzt und die Zahl der intrazellulär gelagerten Brucellen durch verschieden lange Inkubationszeit des beimpften Blutes variiert werden konnte. Ferner war es ohne großen Aufwand möglich, das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung durch andere Verfahren zu überprüfen.

1. Untersuchung des Phagocytosevorganges in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer

Um die Natur der unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen besser beurteilen zu können, sollte zunächst ein Einblick gewonnen werden über die Anordnung der in den Blutausstrichen vorliegenden morphologischen Elemente und die Lokalisierung der dem Blut zugefügten Brucellen in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer des Blut-Brucellengemisches. Es wurde Blut brucelloseinfizierter Meerschweinchen, das Brucellen-Antikörper enthielt, und Blut gesunder Meerschweinchen verwendet. Nach der Vermischung des Zitratblutes mit der Brucellensuspension wurden in Abständen von 5 Minuten Ausstriche angefertigt und nach Färbung mit Toluidinblau untersucht.

Im Plasma waren blaugefärbte pflastersteinähnliche Gebilde zu erkennen, deren Durchmesser ungefähr 1/10 Durchmesser der Granulocyten entsprach. Diese Gebilde kamen in größeren und kleineren Ansammlungen vor und lagen in der Regel im Bereich der neutrophilen Granulocyten. Bei der Untersuchung

des Blutes infizierter Meerschweinchen zeigten sich in den sofort nach der Vermischung von Zitratblut mit der Brucellenaufschwemmung angefertigten Ausstrichen kleine Granulocytenansammlungen. Ihre Zahl und Größe vermehrte sich im Verlaufe der Zeit und erreichte nach 20 Minuten langer Bebrütung ihren Höhepunkt. Insbesondere die neutrophilen Granulocyten, aber auch die eosinophilen Granulocyten und in geringerem Maße auch die Lymphocyten lagerten sich medaillonförmig um die durch ihre Dichte dunkelblau erscheinenden pflastersteinähnlichen interzellulären Massen. Bereits bei der Untersuchung nach 5 Minuten fanden sich auf diesen Gebilden Brucellen. Später tauchten die ersten Brucellen im Zytoplasma der neutrophilen Granulocyten auf. In den nach 25 Minuten oder später angefertigten Ausstrichen lagen die mit Brucellen beladenen Leukocyten wieder mehr verteilt. Im Blut gesunder Meerschweinchen kam es nur in geringem Maße zu einer Ansammlung von Granulocyten. In keinem Fall wurden mehr als 5 gefunden, während es im Blut infizierter Tiere häufig 30 und mehr waren. Im Normalblut lagen auf den schwach hellblau gefärbten interzellulären Substanzen nur gelegentlich Brucellen. Selten wurden einzelne Brucellen phagocytiert.

2. Prüfung der Primärfluoreszenz

Unbehandelte Ausstriche, die sofort nach der Herstellung untersucht wurden, zeigten kaum Fluoreszenzerscheinungen. Mit zunehmender Austrocknung nahm die Primärfluoreszenz innerhalb weniger Minuten zu. Besonders stark fluoreszierten die Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulocyten im dunkler leuchtenden Zytoplasma. Die Fluoreszenz war von grüner Farbe. Die Lymphocyten zeigten eine dunklere, graugrüne homogene Fluoreszenz. Die Erythrocyten lagen als dunkle runde Gebilde im schwach fluoreszierenden Blutplasma. Die Primärfluoreszenz der pflastersteinähnlichen interzellulären Substanzen trat besonders im Zentrum in Erscheinung. Bei der Untersuchung von Blut, das auf den

Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt wurde, traten nach ungefähr 10 Minuten die ersten Fluoreszenzerscheinungen auf, die sich mit zunehmender Austrocknung verstärkten und schließlich zu den oben beschriebenen Fluoreszenzerscheinungen führten.

3. Färbung der Ausstriche mit Fluorescein-isocyanatkonjugaten

Es wurden Ausstriche von 20 und 40 Minuten lang mit Brucellen inkubiertem Blut untersucht.

Nach der Färbung mit Fluorescein-isocyanatkonjugaten trat die bei den unbehandelten Präparaten beobachtete Fluoreszenz der Granulocyten, Lymphocyten und des Plasmas sowie der pflastersteinähnlichen interzellulären Substanzen verstärkt auf. Kontrollpräparate, die an Stelle mit Fluorescein-isocyanatkonjugaten mit NaCl bebrütet, sonst aber in der gleichen Weise behandelt worden waren, zeigten die gleichen Fluoreszenzerscheinungen in geringerer Stärke. Es war nicht möglich, die Brucellen auf den pflastersteinähnlichen Massen und in den neutrophilen Granulocyten eindeutig von den unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen abzugrenzen.

4. Versuche, die unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen der Gewebselemente durch Modifikation der Färbetechnik zu vermindern

Den voraufgegangenen Versuchen war zu entnehmen, daß die unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen durch eine Primärfluoreszenz bedingt waren, die nach der Anfärbung mit Konjugaten noch erheblich verstärkt wurde. Die Primärfluoreszenz konnte nicht ausgeschaltet, doch durch alsbaldige Untersuchung der Präparate hintan gehalten werden. Die Steigerung der Primärfluoreszenz nach der Anfärbung mußte auf das Vorhandensein freien Farbstoffes im Konjugat zurückgeführt werden, denn bei den mit physiologischer NaCl angefertigten Kontrollpräparaten war die Leuchtintensität

der unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen weniger stark ausgeprägt.

Es bestand jedoch die Möglichkeit, daß neben dem freien Farbstoff im Konjugat die zur Anfärbung erforderliche Fixierung der Präparate an der Färbung der unspezifischen Fluoreszenz mitwirkte. Es wurde deshalb geprüft, ob durch den Wechsel der Fixationsmittel eine Verbesserung zu erzielen war.

a) Anwendung verschiedener Fixierungsmittel

Die Ausstriche wurden mit Aceton, Äthanol, Chloroform oder Bouinscher Lösung in der im Abschnitt I,9 angegebenen Weise fixiert und unmittelbar danach sowie nach dem Färben mit Konjugat untersucht.

Nach der Fixierung nahm die grünliche Fluoreszenz der Lymphocyten, der Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulocyten sowie deren Zytoplasma und der interzellulären pflastersteinähnlichen Substanzen in der Reihenfolge Aceton - Chloroform - Äthanol zu. Die Dauer der Fixierung schien keinen Einfluß auf dieses Ergebnis zu haben. Bei der Fixierung mit Bouinscher Lösung zeigte die primäre Fluoreszenz der Lymphocyten, der Granulocyten und der interzellulären Substanzen einen gelblichen Farbton.

Es war demnach nicht möglich, die bei den mit Konjugat gefärbten Präparaten festzustellende Vermehrung der unspezifischen Fluoreszenz durch einen Wechsel des Fixierungsmittels hintanzuhalten.

b) Vorbehandlung der Ausstriche mit Farbstoffen, um die unspezifische Fluoreszenz farblich zu differenzieren

Die Feststellung, daß nicht chemisch gebundener Farbstoff in den Konjugaten erheblich zur Steigerung der unspezifischen Fluoreszenz beitrug, war um so folgenschwerer, als wir die Konjugate durch Behandlung mit Kohle möglichst vollständig von freiem und adsorbiertem Farbstoff befreit und dabei in Kauf genommen hatten, daß sich auch die

Färbungsintensität der Brucellen erheblich verminderte. Wir sahen daher keine direkte Möglichkeit, die unspezifischen Anfärbungen der Gewebselemente durch die Konjugate zu verhüten, sondern machten den Versuch, diejenigen Gewebselemente, die eine Affinität zum fluoreszierenden Farbstoff hatten, durch Vorbehandlung der Ausstriche mit einem nicht in grüner Farbe fluoreszierenden Farbstoff anzufärben. Dadurch sollten diese Gewebsteile für das Fluorescein-isocyanat "blockiert" und von den mit Konjugatantikörpern sich grünlich anfärbenden Brucellen farblich differenziert werden.

Von den geprüften Farbstoffen Phenolphthalein, Methylenblau, Akridinorange, Rhodamin B 200, Toluidinblau, Neutralrot und Phloxin ergaben Akridinorange und RB 200 eine kräftige Anfärbung. Akridinorange war aber auf Grund seiner in geringer Konzentration grünen Fluoreszenz als Gegenfarbe zum Fluorescein-isocyanat unbrauchbar.

RB 200, das in Aceton gelöst worden war, wurde in einer Konzentration von 1:10, 1:100 usw. jeweils um eine Zehnerpotenz steigend bis 1:1 Mill. angewendet. Bei Konzentrationen unter 1:1000 wiesen die Erythrocyten eine dunkelrote, die Granula der Leukocyten eine leuchtend orangefarbene Fluoreszenz auf. Von der Verdünnung 1:1000 ab waren die Erythrocyten im schwach gefärbten Plasma schattenhaft erkennbar, während die weißen Blutkörperchen, insbesondere ihre Granula, weiterhin eine leuchtend orangefarbene Fluoreszenz besaßen. Diese Fluoreszenz verblaßte bei 1:10000 und ging bei 1:100000 in einen grüngelben Farbton über. Bei 1:1 Mill. bestand kein Unterschied zu den lediglich mit Aceton behandelten Ausstrichen. Bei der anschließenden Nachfärbung mit unkonjugiertem Fluoresceinisocyanat wurde festgestellt, daß das zur Vorfärbung benutzte RB 200 nicht stärker als im Verhältnis 1:1000 verdünnt werden durfte, sollte eine Überfärbung mit dem grünlichen Fluorescein-isocyanat vermieden werden. Diese Konzentration erschien auch nach einer Prüfung von RB 200-Konzentrationen von 1:500 und 1:5000 als optimal.

Nunmehr wurden Blutausstriche mit RB 200-Konzentrationen von 1:500, 1:1000, 1:5000 und 1:10000 gefärbt und anschließend mit dem Konjugat behandelt. Als Kontrolle dienten Ausstriche, die in gleicher Weise mit RB 200 vorgefärbt und nicht mit Konjugat, sondern mit NaCl bebrütet worden waren.

Bei den konjugatgefärbten Ausstrichen zeigten die weißen Blutkörperchen folgendes Fluoreszenzverhalten: Die Lymphocyten waren dunkelgrün. Unter den zusammengelagerten Leukocyten gab es kleinere Granulocyten mit grünem Zytoplasma und leuchtend grünen Granula. Daneben waren größere Granulocyten mit großen goldgelb fluoreszierenden Granula vorhanden. Nach Häufigkeit und Kernstruktur handelte es sich bei den größeren um eosinophile Granulocyten. Die zwischen den Zellen liegenden amorphen Massen besaßen eine teils dunkel-, teils hellgrüne Fluoreszenz. Die mit NaCl bebrüteten Kontrollausstriche zeigten die gleiche Fluoreszenz wie die mit Konjugat behandelten.

Der Blockierungsversuch mit RB 200 führte somit nicht zum Ziel. Die Nachfärbung mit Fluorescein-isocyanat rief keine Grünfluoreszenz der Leukocyten hervor. Wurden die Ausstriche aber mit dem Fluorescein-isocyanatkonjugat oder physiologischer NaCl bebrütet, dann war - die eosinophilen Granulocyten ausgenommen - wieder eine unspezifische Grünfluoreszenz zu beobachten.

5. Direkte Fluorochromierung der Brucellen und ihr Nachweis im Gewebe

Nach dem Fehlschlagen unserer Bemühungen, die Brucellen mit fluoreszierenden Antikörpern ausreichend kräftig anzufärben und die unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen der Gewebsteile zu verhindern bzw. farblich abzugrenzen, tauchte die Frage auf, ob der Verbleib der Brucellen im infizierten Organismus für eine begrenzte Zeit nach der Infektion nicht auch durch Verwendung fluorochromierter

Keime verfolgt werden könnte. Die Fluorochromierung sollte durch Züchtung der Brucellen auf farbstoffhaltigen Nährböden herbeigeführt werden. Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, daß die fluorochromierten Brucellen eine kräftigere Fluoreszenz als die mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbten aufweisen würden, so daß ihre Unterscheidung von der Primärfluoreszenz der Gewebselemente besser gelingen konnte. Dies um so mehr, als die Primärfluoreszenz durch den Wegfall der Konjugatbehandlung der Präparate keiner Verstärkung durch freien Farbstoff im Konjugat unterliegen würde. Es wurde geprüft, ob die Brucellen beim Wachstum auf farbstoffhaltigen Nährböden den Farbstoff aufnahmen, dabei noch vermehrungsfähig blieben und wie lange die Fluoreszenz anhielt. Schließlich wurden die fluorochromierten Brucellen dem Zitratblut zugefügt und nach verschieden langer Bebrütungszeit Ausstriche angefertigt, die im Fluoreszenzlicht auf Brucellen untersucht wurden.

a) Wachstum der Brucellen auf farbstoffhaltigen Nährböden und Farbstoffspeicherung

Zur Ermittlung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe wurden im Vorversuch die Fluorochrome Fluorescein-isocyanat, RB 200, Phloxin und Akridinorange geprüft. Das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung der Keime auf Fluoreszenz sowie ihre Vermehrungsfähigkeit auf den farbstoffhaltigen Nährböden sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Wachstum und Anfärbung von Brucellen, die auf farbstoffhaltigen Nährböden gezüchtet wurden

Farbstoff und Farbstoffkonzentration im Nährboden		Wachstum	Anfärbung der Brucellen nach 4-tägiger Bebrütung
1.Fluoresc.isoc.a)	2,0/25	+-	graugrün
b)	0,2/25	++	schwach graugrün
c)	0,02/25	++	schwach graugrün
2.RB 200 a)	1:100	+-	keine Differenz.mögl.[1)]
b)	1:1000	++	orange
c)	1:10000	++	matt orange
3.Phloxin a)	1:100	-	-
b)	1:1000	+-	graugrün
c)	1:10000	++	schwach graugrün
4.Akridinorange a)	1:100	+-	rot
b)	1:1000	+-	rot und grün
c)	1:10000	++	grün

1) = Da zuviel freier Farbstoff in der Abschwemmung war, hoben sich die Brucellen vom Hintergrund nicht ab.
- = Kein Wachstum
+- = Wachstum in Einzelkolonien
++ = Dichtes Wachstum

Die zur Kontrolle auf Albimiagar ohne Farbstoffzusatz gezüchteten Keime fluoreszierten nicht. Aus der Tabelle kann entnommen werden, daß Fluorescein-isocyanat und Phloxin nicht in dem für den mikroskopischen Nachweis erforderlichen Maße von den Brucellen gespeichert wurde. In hoher Konzentration dem Nährboden zugefügtes RB 200 wurde in einer zum Nachweis ausreichenden Menge aufgenommen, führte aber nicht zu einer ebenso guten Fluoreszenz, wie sie bei den auf Akridinorange enthaltenden Nährböden gewachsenen Brucellen festzustellen war. Die weiteren Versuche wurden nur noch mit Akridinorange und RB 200 durchgeführt.

b) Prüfen der Festigkeit, mit der der Farbstoff im Bakterienzelleib verankert war

Zur Prüfung der Festigkeit, mit der der Farbstoff in den Brucellen verankert war, wurden die Keime nach der Abschwemmung vom Nährboden in physiologischer NaCl aufbewahrt. Nach 5, 6 1/2, 22 und 120 Stunden wurden sie abzentrifugiert, mit frischer NaCl aufgeschwemmt und Proben der Brucellen und der Suspensionsflüssigkeit auf Fluoreszenz untersucht. Die Suspensionen wurden mit Keimen hergestellt, die auf RB 200 und Akridinorange enthaltenden Nährböden gewachsen waren. Die Farbstoffkonzentration im Nährboden betrug 1:100, 1:1000 und 1:10000. Als Maß für den abgegebenen Farbstoff wurden die Farbtöne der dekantierten Überstände und unter dem Fluoreszenzmikroskop die Fluoreszenzerscheinung des Hintergrundes der Brucellenpräparate herangezogen (Tab. 6).

Tab. 6: Prüfung der auf RB 200-haltigen Nährböden gewachsenen Brucellen auf Farbstoffverankerung nach Aufbewahrung in physiologischer NaCl

Farbst. Konz.i. Nährbd. 1:	Brucellen			Hintergrundfärbg. d.Bruc.präparate			Suspensions-überstand		
	100	1000	10000	100	1000	10000	100	1000	10000
Nach 5 Std.	o	orange ++	orange +	orange +++	_1)	-	rot	rosa	rosa
Nach 6 1/2 St.	orange ++	orange ++	orange +	rot	-	-	rosa +++	rosa ++	rosa +
Nach 22 Std.	orange ++	orange ++	orange +	-	-	-	rosa ++	rosa +	_2)
Nach 120 St.	orange ++	orange ++	-	-	-	-	rosa +	-	-

1) = Dunkler Hintergrund
2) = Farbloser Überstand
o = Keine Differenzierung möglich, da der Hintergrund zu hell ist.

Tab. 7: Prüfung der auf Akridinorange-haltigen Nährböden gewachsenen Brucellen auf Farbstoffverankerung nach Aufbewahrung in physiologischer NaCl

Farbst. Konz.i. Nährbd. 1:	Brucellen			Hintergrundfärbg. d.Bruc.präparate			Suspensions-überstand		
	100	1000	10000	100	1000	10000	100	1000	10000
Nach 5 Std.	grün+ rot	grün+ rot	grün	grün-lich	grün-lich	_1)	gold-gelb	_2)	-
Nach 6 1/2 St.	grün	grün	grün	-	-	-	-	-	-
Nach 22 Std.	grün	grün	grün	-	-	-	-	-	-
Nach 120 St.	grün	grün	grün	-	-	-	-	-	-

Erklärung: S. Tab. 6

Aus den beiden Tabellen ist zu ersehen, daß die Anfärbung des Hintergrundes und der dekantierten Überstände von der Konzentration des Farbstoffes im Nährboden abhängig war. Darüber hinaus zeigte es sich, daß die auf RB 200-haltigen Nährböden gewachsenen Brucellen noch nach der 4. Erneuerung der Suspensionsflüssigkeit Farbstoff abgaben, die auf Nährböden mit Akridinorangezusatz gezüchteten dagegen nicht. Eine Verminderung der Farbintensität der Brucellen im Verlaufe der Aufbewahrung trat nur bei den Proben auf, die von RB 200-haltigen Nährböden mit einem Farbstoffzusatz von 1:10000 stammten. Die Fluoreszenz dieser Keime war bereits unmittelbar nach der Abschwemmung geringer als die der auf Nährböden mit stärkerem Farbstoffgehalt gewachsenen. Außerdem ging die bei einem Teil der auf den Nährböden mit Akridinorange im Verhältnis 1:100 und 1:1000 gezüchteten Keime zunächst zu beobachtende Rotfluoreszenz nach 6 1/2 Stunden in eine Grünfluoreszenz über. Die Fluoreszenz der auf Akridinorange-haltigen Nährböden gewachsenen Brucellen war deutlich kräftiger als die Fluoreszenz der Keime, die auf dem mit RB 200 versetzten Agar gezüchtet worden waren.

Zur Beurteilung der Vermehrungsfähigkeit wurde nach dem letzten Wechsel der Suspensionsflüssigkeit je eine Öse der Keime auf Albimischrägagarröhrchen verimpft. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Prüfung der Vermehrungsfähigkeit der auf RB 200 und Akridinorange enthaltenden Nährböden gewachsenen Brucellen nach 120-stündiger Aufbewahrung der Abschwemmungen

Farbstoffkonzentr.i.Nährboden		Wachstum nach Überimpfung
1. RB 200	1:100	-
	1:1000	+
	1:10000	+
2. Akridinorange	1:100	-
	1:1000	+
	1:10000	+

Wie die Tabelle zeigt, waren auf den Nährböden mit einem Farbstoffzusatz von 1:100 gewachsene Keime nach 5-tägiger Aufbewahrung nicht mehr vermehrungsfähig.

Für die weiteren Untersuchungen wurden fluorochromierte Brucellen verwendet, die auf Albiminährböden mit einer Akridinorangekonzentration von 1:10000 gewachsen waren.

c) Nachweis der fluorochromierten Brucellen im Blut

Zitratblut normaler und infizierter Meerschweinchen wurde im Verhältnis 1:1 mit Aufschwemmungen fluorochromierter Brucellen versetzt und bebrütet. Sofort nach der Zugabe der Brucellen, nach 5 Minuten, 10 Minuten und 20 Minuten langer Bebrütung wurden Ausstriche angefertigt.

Bei den sofort nach Zugabe der fluorochromierten Brucellen zum Blut angefertigten Ausstrichenwaren die grüngelb fluoreszierenden Brucellen gut erkennbar. Die Granula und das Cytoplasma der Granulocyten, die Lymphocyten und die interzellu-

lären amorphen Substanzen zeigten jedoch eine stärkere Fluoreszenz als die entsprechenden Blutelemente in Kontrollblutproben, denen ungefärbte Brucellen zugegeben worden waren.

Nach 5 Minuten langer Bebrütung hatte die Leuchtkraft der Brucellen merklich nachgelassen, die Fluoreszenz der Granulocyten, Lymphocyten und interzellulären amorphen Substanzen hingegen zugenommen. Der Ausgleich in der Fluoreszenz war nach 10 Minuten langer Bebrütung vollständig. Von jetzt an waren die Erreger nicht mehr erkennbar.

Besprechung

Bei den Versuchen zur Verbesserung der Konjugate wurden vornehmlich zwei Ziele verfolgt. Einmal sollte die Menge des an das Antikörpereiweiß gebundenen Farbstoffes erhöht und dadurch die Intensität der Fluoreszenz der mit den Konjugaten gefärbten Brucellen gesteigert werden. Zum anderen sollten die Konjugate unspezifische Fluoreszenzerscheinungen, die sich aus der Anlagerung unkonjugierter Serumproteine an Gewebsteile oder durch das Vorhandensein nicht gebundenen Farbstoffes ergeben konnten, möglichst nicht hervorrufen. Die Grundlage für die Präparation der Konjugate mit RB 200 boten die Angaben von CHADWICK, MC ENTEGART und NAIRN (6), bei der Herstellung der Fluorescein-isocyanatkonjugate folgten wir der Veröffentlichung von POETSCHKE, UEHLECKE und KILLISCH (72).

Die Maßnahmen zur Verbesserung der Antigenanfärbung waren: Erhöhung der Farbstoffmengen bei der Präparation der RB 200- und der Fluorescein-isocyanatkonjugate, Steigerung des Dioxan- und Acetonanteiles in der Reaktionslösung bei der Herstellung der Fluorescein-isocyanatkonjugate und schließlich Konjugationsversuche mit Fluorescein-isocyanat in reinem Aceton-Dioxanmedium. Bei der Steigerung des Dioxananteiles gingen wir von der Mitteilung von CREECH und JONES (18, 19) aus, wonach eine Erhöhung des Dioxananteiles von 15 % auf 30 % die Menge des gebundenen Farbstoffes auf das Zwei- bis Dreifache steigerte. Der Acetonanteil wurde deshalb vermehrt, weil COONS und KAPLAN (15) einen größeren Acetonanteil in der Reaktionslösung gebraucht hatten, als von POETSCHKE, UEHLECKE und KILLISCH (72) angegeben worden war. Keines der erprobten Verfahren vermochte die Farbstoffbindung an das Antikörpereiweiß so zu steigern, daß eine erhebliche Verbesserung der Fluoreszenz der mit den Konjugaten gefärbten Brucellen zustande kam.

Der Entfernung des nicht chemisch gebundenen Farbstoffes sowie der konjugierten unspezifischen Serumproteine diente das Schütteln der Konjugate mit Kohle- und Leberpulver. Dieses Vorgehen hatten CHADWICK, MC ENTEGART und NAIRN (6) für die RB 200- und HELLER und JAKULIS (38) sowie FINKELSTEIN und LA BREC (26) für die Fluorescein-isocyanatkonjugate empfohlen.

Die elektrophoretische Untersuchung der RB 200-Konjugate ergab, daß in den Präparaten vor der Kohlebehandlung beträchtliche Mengen von freiem Farbstoff enthalten waren. Aber nicht nur das im Pherogramm sichtbare, aus dem freien Farbstoff gebildete Band verschwand nach der Behandlung, sondern auch die Farbintensität der Eiweißfraktionen verminderte sich nach der Kohlebehandlung beträchtlich. Dieser Beobachtung kann entnommen werden, daß ein Teil des mit dem Eiweißkörper verknüpften Farbstoffes nicht chemisch gebunden, sondern lediglich adsorbiert war.

Der nach der Kohlebehandlung eintretende Verlust an Färbungskraft war bei allen Konjugaten unabhängig von der angewandten Präparationstechnik erheblich und ließ darauf schließen, daß bei einer kräftigen Fluoreszenz der Brucellen ein großer Teil des dabei mitwirkenden Farbstoffes nicht auf dem Wege über die Antikörper, sondern als freier Farbstoff oder adsorbierter Farbstoff an die Brucellen gelangte. Auch die Verstärkung der Fluoreszenz, die bei den Fluorescein-isocyanatkonjugaten durch Steigerung des Dioxananteiles auf 20 % erreicht werden konnte, beruhte nur auf der Zunahme des adsorbierten Farbstoffes. Denn nach dem Schütteln mit Kohle war der Unterschied zu den anderen Präparationen nur noch geringfügig. Gleiches haben in eingehenden Untersuchungen CHADWICK und NAIRN (7) an Fluorescein-isocyanatkonjugaten festgestellt. Die Behandlung der Konjugate nach der Dialyse mit Organpulvern führte zu einer Beseitigung von 70 % des an das Eiweißmolekül adsorbierten Farbstoffes. Die Autoren fanden, daß die Stärke der Anfärbung des Antigens weitgehend durch den freien und adsorbierten, chemisch nicht gebundenen Farbstoff

im Konjugat bestimmt wurde. CHADWICK und NAIRN (7) hielten daher eine restlose Entfernung dieser Farbstoffbestandteile für Fluorescein-isocyanatkonjugate, die für Routineuntersuchungen bestimmt sind, nicht für angebracht.

Obwohl wir unsere Untersuchungen mit Kohle-behandelten Konjugaten durchführten, traten in den Blutausstrichen unspezifische Fluoreszenzerscheinungen auf. Sie wurden vornehmlich an den Leukocyten beobachtet, und zwar fluoreszierten besonders kräftig die Leukocytengranula, die sich hinsichtlich Form und Größe nicht von den Brucellen unterscheiden ließen. Neben den weißen Blutkörperchen fluoreszierten im Plasma liegende unregelmäßig begrenzte amorphe Substanzen, die bei infizierten Tieren medaillonförmig von Granulocyten umgeben wurden und auf denen sich die Brucellen ablagerten, bevor es zur Phagocytose kam. Diese Gewebsfluoreszenz war, wie die Untersuchung unbehandelter Präparate ergab, vornehmlich auf die Primärfluoreszenz zurückzuführen. Sie hatte eine graugrüne bis grüne Farbe und wurde mit zunehmender Austrocknung der Präparate intensiver. Dieser Befund entspricht der Feststellung von STÜBEL (86), daß festes und trockenes Gewebe eine stärkere Fluoreszenz aufweist als lockeres und feuchtes. Durch die Fixierung der Präparate wurde die Primärfluoreszenz verstärkt, was sich durch keines der erprobten Fixierungsmittel verhindern ließ. Dies dürfte sich daraus erklären, daß die Fixierung in jedem Fall mit einem Wasserverlust einhergeht. Neben der durch die Fixierung gesteigerten Primärfluoreszenz mußte aber auch im Konjugat vorhandener freier oder wieder in Freiheit gesetzter Farbstoff für die unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen verantwortlich gemacht werden. Deshalb wurden die Ausstriche mit dem rot fluoreszierenden RB 200 vorbehandelt in der Absicht, die Aufnahmefähigkeit der Leukocyten gegenüber dem grünlich fluoreszierenden freien Fluorescein-isocyanat des Konjugates zu blockieren. Bei einer Nachfärbung mit Aceton-gelöstem Fluorescein-isocyanat blieb die durch das RB 200 herbeigeführte Rotfluoreszenz bestehen, bei anschließender Konjugatbehandlung

jedoch oder bei der Bebrütung mit physiologischer NaCl verschwand sie wieder. Wahrscheinlich bewirkte das wäßrige Medium, vielleicht im Verein mit der Brutschranktemperatur, die Herauslösung des Farbstoffes.

Für die direkte Fluorochromierung der Brucellen wurde der Weg der Züchtung auf farbstoffhaltigen Nährböden gewählt. Akridinorange war am besten geeignet, da es in Konzentrationen, die die Vermehrungsfähigkeit der Brucellen nicht beeinträchtigten, eine kräftige Fluoreszenz der Keime herbeiführte. Die Brucellen gaben den Farbstoff bei Aufbewahrung in physiologischer NaCl, die unter wiederholtem Wechsel des Mediums auf 5 Tage ausgedehnt wurde, nicht wieder ab. Es konnte deshalb eine ausreichend feste Verankerung des Farbstoffes im Bakterienzelleib angenommen werden. Nach Vermischen mit Zitratblut ging die Fluoreszenz jedoch in ganz kurzer Zeit unter zunehmender Fluoreszenz der die Brucellen umgebenden Gewebsteile verloren.

Nach dem Ergebnis unserer Untersuchungen gelingt die Anfärbung von Brucellen mit Antikörpern, die mit Rhodamin B 200 oder Fluorescein-isocyanat gekoppelt sind, nicht zuverlässig. Eine kräftige Fluoreszenz war nur zu erreichen, wenn die Konjugate noch freien oder lediglich adsorbierten Farbstoff enthielten. Nach Entfernung dieses Farbstoffes färbten die Konjugate die Brucellen nur schwach an. Infolgedessen machten sich die in brucellenhaltigen Blutausstrichen auftretenden unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen störend bemerkbar. Sie fluoreszierten nicht weniger intensiv als die Brucellen und ließen sich mit den von uns erprobten Mitteln von Brucellenansammlungen nicht unterscheiden. In der Verwendung von nicht mit Kohle geschüttelten Konjugaten dürfte kein Vorteil zu erblicken sein, denn der freie Farbstoff würde zwar die Brucellen kräftiger anfärben, gleichzeitig aber eine Vermehrung der unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen verursachen.

Zusammenfassung

1. Bei der Konjugation mit RB 200 mit steigenden Farbstoffmengen kam es zu einer elektrophoretisch nachweisbaren vermehrten Anfärbung der Proteine. Fluoreszenzmikroskopisch dagegen konnte mit Antikörpern, die mit erhöhten Farbstoffmengen konjugiert worden waren, keine befriedigenden Anfärbungen der Brucellen erzielt werden.

   Zur Verbesserung der Fluoreszenz bei Fluorescein-isocyanatkonjugaten wurden γ-Globulinlösungen von Brucella-Immunseren mit erhöhter Farbstoffmenge, mit erhöhtem Dioxangehalt sowie Dioxan- und Acetongehalt in der Reaktionslösung und in reinem Aceton bzw. Aceton-Dioxanmedium konjugiert. Diese Versuche verliefen erfolglos. Bei der Erhöhung des Dioxangehaltes in der Reaktionslösung kam es lediglich zu einer vermehrten Adsorption des Farbstoffes an das Eiweißmolekül.

2. Blutproben gesunder und Brucellen-infizierter Meerschweinchen wurden in vitro mit Brucellen vermischt, bebrütet und ausgestrichen. Diese Ausstriche wurden mit Fluorescein-isocyanatkonjugat gefärbt. Von den unspezifischen Fluoreszenzerscheinungen im Blut konnte die spezifische Fluoreszenz der Brucellen nicht unterschieden werden. Versuche zur Verminderung der Primärfluoreszenz durch Anwendung verschiedener Fixierungsmittel und Versuche zur Blockierung der Aufnahmefähigkeit der Lymphocyten, Granulocyten und interzellulären amorphen Substanzen für freies Fluorescein-isocyanat im Konjugat durch Vorbehandlung der Ausstriche mit RB 200 scheiterten.

3. Brucellen wurden durch Züchtung auf farbstoffhaltigen Nährböden vitalfluorochromiert in der Absicht, sie nach der Zugabe zum Meerschweinchenzitratblut in den Ausstrichen fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. Hinsichtlich der

Anfärbung und der Erhaltung der Vermehrungsfähigkeit der Brucellen erwies sich Akridinorange in einer Konzentration von 1:10000 im Nährboden als optimal. Wurden die so gefärbten Keime mit Meerschweinchenzitratblut vermischt, kam es zu einer allmählichen Fluoreszenzabnahme der Brucellen und zu einer zunehmenden Fluoreszenz der Lymphocyten, Granulocyten und der interzellulären amorphen Substanzen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Boyer, G.S., F.W. Denny u. H.S. Ginsberg — Intracellular localization of type 4 adenovirus. J. Exper. Med. 109, 85 (1959)

2. Breitenfeld, P.M.u. W. Schäfer — The formation of fowl plague virus antigens in infected cells, as studied with fluorescent antibodies. Virology 4, 328 (1957)

3. Bucherer, H. — Experimentelle Untersuchungen über die Fluoreszenzfärbung toter und lebender Bakterien nach Strugger. Zbl. Bakt. Abt. II. 106, 81 (1944/45)

4. Buckley, S.M., E. Whitney u. F. Rapp — Identification by fluorescent antibody of development forms of psittacosis virus in tissue. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 90, 226 (1955)

5. Carter, C.H. u. J.M. Leise — Specific staining of various bacteria with a single fluorescent antiglobulin. J. Bact. 76, 152 (1958)

6. Chadwick, C.S., M.G. Mc Entegart u. R.C. Nairn — Fluorescent protein tracers: A trial of new fluorochromes and the development of an alternative to fluorescein. Immunology 1, 315 (1958)

7. Chadwick, C.S. u. R.C. Nairn — Fluorescent protein tracers: The unreacted fluorescent material in fluorescein conjugates and studies of conjugates with other green fluorochromes. Immunology 3, 363 (1960)

8. Charter, C.H. — Staining of coagulase-positive staphylococci with fluorescent antisera. J. Bact. 77, 670 (1959)

9. Cherry, W.B. u. E.M. Freeman — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 175, 582 (1959)

10. Coffin, D.D., A.H. Coons u. V.J. Cabasso — A histological study of infectious canine hepatitis by means of fluorescent antibody. J. Exper. Med. 98, 13 (1953)

11. Cohen, S.M. u.a. — Fluorescent antibody and complement fixation tests of agents isolated in tissue culture from measles patients. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 90, 118)1955)

12. Coons, A.H. u.a. — The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibodies J. Immunol. 45, 159 (1942)

13. Coons, A.H. u.a. — Localisation of antigen in tissue cells. IV. Antigens of rickettsiae and mumpsvirus J. Exper. Med. 91, 31 (1950)

14. Coons, A.H., H.J. Creech u. R.N. Jones — Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group Proc. Soc. Exper. Biol.Med. 47, 200 (1941)

15. Coons, A.H. u. M.H. Kaplan — Localization of antigen in tissue cells: II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody J. Exper. Med. 91, 1 (1950)

16. Coons, A.H., E.H. Leduc u. J.M. Connolly — Studies on antibody production I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit J. Exper. Med. 102, 49 (1955)

17. Coons, A.H., E.H. Leduc u. M.H. Kaplan — Localization of antigen in tissue cells: VI. The fate of injected foreign proteins in the mouse J. Exper. Med. 93, 173 (1951)

18. Creech, H.J. u. N. Jones — The conjugation of horse serum albumin with isocyanates of certain polynuclear aromatic hydrocarbons J. Amer. Chem. Soc. 63, 1661 (1941)

19. Creech, H.J. u. N. Jones — Conjugates synthazised from various proteins and the isocyanates of certain aromatic polynuclear hydrocarbons J. Amer. Chem. Soc. 63, 1670 (1941)

20. Dacres, W.G. u. A.H. Groth — Identification of Erysipelothrix insidiosa with fluorescent antibody J. Bact. 78, 298 (1959)

21. Deacon, W.E., V.H. Falcone u. A. Harris — A fluorescent test for treponemal antibodies Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 96, 477 (1957)

22. Deacon, W.E., E.M. Freeman u. A. Harris — Fluorescent treponemal antibody test. Modification based on quantitation (FTA-200) Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 103, 829 (1960)

23. Deibel, R. u. J.E. Hotchin — Quantitative applications of fluorescent antibody technique to influenza-virus-infected cell cultures Virology 8, 367 (1959)

24. Dowdle, W.R. u. P.A. Hansen — Labelling of antibodies with fluorescent azo-dyes J. Bact. 77, 669 (1959)

25. Fellinger, K. u. F. Pakesch — Fluoreszenzmikroskopie im hämatologischen Bereich Klin. Med. 3, 569 (1948)

26. Finkelstein, R.A.u. E.H. La Brec — Rapid identification of cholera vibrios with fluorescent antibody J. Bact. 78, 886 (1959)

27. Fischl, V. u. E. Schwenk — Fluoreszenzmikroskopie als chemotherapeutische Forschungsmethode Klin. Wschr. 11, 1114 (1932)

28. Flegel, H. — Untersuchungen an fluorochromierten Mikrobienkulturen Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 159, 342 (1952/53)

29. Franklin, R.M. — Growth of fowl plague virus in tissue cultures of chicken macrophages and giant cells Virology 6, 81 (1958)

30. Goldwasser, R.A.u. C.C. Shepard — Staining of complement an modifications of fluorescent antibody procedures J. Immunol. 80, 122 (1958)

31. Goldwasser, R.A.u. R.E. Kissling — Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens in mouse brains Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 98, 219 (1958)

32. Gordon, M.A. — Differentiation of yeasts by means of fluorescent antibody Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 97, 694 (1958)

33. Hagemann, P. — Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Virus und andere Mikroben Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 140, 184 (1937)

34. Hagemann, P. — Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Leprabakterien im Nasenschleim und im Blut Dtsch. med. Wschr. 63, 514 (1937)

35. Hagemann, P. — Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin Münch. med. Wschr. 85, 1066 (1938)

36. Halperen, S., P. Donaldson u. S.E. Sulkin — Identification of streptococci in bacterial mixtures and clinical specimens with fluorescent antibody J. Bact. 76, 223 (1958)

37. Harms, F. — Fluoreszenzmikroskopie und Milchhygiene Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 65, 91 (1952)

38. Hèller, P. u. V.J. Jakulis — Antigenicity of connective tissue extracts. II. Stimulation of auto- and iso-antibodies by heterologous antigen Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 104, 590 (1960)

39. Herrmann, W. — Der Nachweis von Tuberkelbazillen im Fluoreszenzmikroskop Dtsch. med. Wschr. 64, 1354 (1938)

40. Hill, A.G.S., H.W. Deane u. A.H. Coons — Localization of antigen in tissue cells: V. Capsular polysaccharide of Friedländer bacillus, type B in mouse J. Exper. Med. 92, 35 (1950)

41. Jancsò, N.v. — Photobiologische Studien in der Chemotherapie. I. Lichtempfindliche Trypanosomen in trypaflavinbehandelten Tieren Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 122, 388 (1931)

42. Jancsò, N.v. — Photobiologische Studien in der Chemotherapie. II. Photodynamisches und therapeutisches Interpherenzphänomen bei der experimentellen Naganainfektion Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 122, 393 (1931)

43. Jancsò, N.v. — Photobiologische Studien in der Chemotherapie. III. Therapeutische und photodynamische Festigung von Naganatrypanosomen durch systematische Behandlung mit Trypaflavin Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 123, 129 (1931)

44. Jancsò, N.v. — Beobachtung chemotherapeutischer Vorgänge im Fluoreszenzmikroskop Klin. Wschr. 11, 689 (1932)

45. Jancsò, N.v. — Wirkungsmechanismus der Chemotherapeutika bei Trypanosomen Klin. Wschr. 11, 1305 (1932)

46. Kaplan, M.H., A.H. Coons u. H.W. Deane — Localization of antigen in tissue cells: III. Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse J. Exper. Med. 91, 15 (1950)

47. Klages, Fr. — Lehrbuch der Organischen Chemie
Bd 1, Hälfte 1.-
Berlin: Verl. de Gruyter 1952. S. 392

48. Klein, H. — Bietet die von Jensen und Gohde beschriebene "fluoreszenzmikroskopische Selektivdarstellung des Tuberkelbazillus" Vorteile gegenüber der Auraminfärbung nach Hagemann?
Berlin, Freie Univ., Vet.-med.Diss 1952

49. Kosenow, W. — Über den Strukturwandel der basophilen Substanz junger Erythrocyten im Fluoreszenzmikroskop
Acta haemat. 7, 360 (1952)

50. Kosenow, W. — Die Fluorochromierung mit Acridinorange, eine Methode zur Beobachtung gefärbter Blutzellen
Acta haemat. 7, 217 (1952)

51. Kosenow, W. — Ein Beitrag zur Frage der sogenannten Achromoretikulocyten
Zschr. Kinderhk. 70, 623 (1952)

52. Kosenow, W. u. H. Mai — Die Fluoreszenzmikroskopie der Blutzellen
Zschr. Kinderhk. 70, 552 (1951)

53. Kosenow, W. u. A. Treibs — Lichtüberempfindlichkeit und Porphyrinämie
Zschr. Kinderhk. 73, 82 (1953/54)

54. Liu, C. — Studies on influenza infection in ferrets by means of fluorescein-labeled antibody. 1. The pathogenesis and diagnosis of the disease
J. Exper. Med. 101, 665 (1955)

55. Liu, C. — Studies on influenza infection in ferrets by means of fluorescein-labeled antibody. 2. The role of "soluble antigen" in nuclear fluorescence and crossreaction
J. Exper. Med. 101, 677 (1955)

56. Liu, C. — Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluorescein-labeled antibody
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 92, 883 (1956)

57. Liu, C. — The use of fluorescent antibody in the diagnosis and study of viral and rickettsial infections
Erg.Mikrobiol.Immunit.forsch. 33, 242 (1960)

58. Liu, C. u. D.L. Coffin — Studies on canine distemper infection by means of fluorescein-labeled antibody. Virology 3, 115 (1957)

59. La Brec, E.H., S.B. Formal u. H. Schneider — Serological identification of shigella flexneri by means of fluorescent antibodies. J. Bact. 78, 384 (1959)

60. Leduc, E.H., A.H. Coons u. J.M. Connolly — Studies on antibody production. II. The primary and secondary responses in the popliteal lymphnode of the rabbit. J. Exper. Med. 102, 61 (1955)

61. Marshall, J.D., W.C. Eveland u. C.W. Smith — Superiority of fluorescein-isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technique with a modification of its application. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 98, 898 (1958)

62. May, J. — Zur fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidung lebender und toter Bakterien mittels Akridinorangefärbung. Zbl.Bakt.Abt.I.Orig. 152, 586 (1947/48)

63. Moody, M.D., M. Goldman u. B. Thomason — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. I. General methods for malleomycespseudomallei. J. Bact. 72, 357 (1955)

64. Moody, M.D., E.C. Ellis u. E.L. Updyke — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. IV. Grouping streptococci with fluorescent antibody. J. Bact. 75, 553 (1958)

65. Moulton, J.E. — Fluorescent antibody studies of demyelination in canine distemper. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 91, 460 (1956)

66. Moulton, J.E. u. C.H. Brown — Antigenicity of canine distemper inclusion bodies as demonstrated by fluorescent antibody technic. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 86, 99 (1954)

67. Noyes, W.F. — Visualization of Egypt 101 virus in the mouse's brain and in cultured human carcinoma cells by means of fluorescent antibody. J. Exper. Med. 102, 243 (1955)

68. Noyes, W.F. u. R.C. Mellors — Fluorescent antibody detection of the antigens of the Shope papilloma virus in papillomas of the wild and domestic rabbit. J. Exper. Med. 106, 555 (1957)

69. Noyes, W.F. u. B.K. Watson — Studies on the increase of vaccine virus in cultured human cells by means of the fluorescent antibody technique J. Exper. Med. 102, 237 (1955)

70. Pereira, H.G., A.L. Allison u. B. Balfour — Multiplication of adenovirus type 5 studied by infectivity titrations and by the fluorescent antibody technique Virology 7, 300 (1959)

71. Petuely, F. u. G. Lindner — Kritische Untersuchungen über die Darmflora. II. Mitteilung: Die Methode der quantitativen Analyse mit Hilfe von fluoreszenz-markierten Antikörpern Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 177, 340 (1960)

72. Poetschke, G., H. Uehlecke u. L. Killisch — Untersuchungen mit fluorescein-markierten Antikörpern. I. Allgemeines und Methodisches Zschr. Immunit. forsch. 114, 393 (1957)

73. Redys, J.J., M.R. Ross u. E.K. Borman — Inhibition of common-antigen fluorescence in grouping streptococci by the fluorescent antibody method J. Bact. 80, 823 (1960)

74. Reitz, A. — Untersuchungen mit photodynamischen Stoffen Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 45, 451 (1908)

75. Reitz, A. — Untersuchungen mit photodynamischen Stoffen Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 45, 374 (1908)

76. Riggs, J.L., P.C. Loh u. W.C. Eveland — A simple fractionation method for preparation of fluorescein-labeled gamma globulin Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 105, 655 (1960)

77. Sachs, L. u. M. Vogel — Polyoma virus synthesis in tumor cells as measured by the fluorescent antibody technique Virology 11, 722 (1960)

78. Schloßhardt, H. u. L. Heilmeyer — Blutzellen im Fluoreszenzlicht Jena. Zschr. Med. Naturw. 75, 90 (1942)

79. Sheldon, W.H. — Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technic in human muscle lesions of leptospirosis icterohemorrhagiae Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 84, 165 (1953)

80. Sjöstrand, F. — Über die Eigenfluoreszenz tierischer Gewebe mit besonderer Berücksichtigung der Säugetierniere
Basel, New York: Verl. Karger 1944
(Acta anat. Suppl. 1 ad vol. 1, 1945/46)

81. Strugger, S. — Die Vitalfärbung der Chromosomen
Dtsch. tierärztl. Wschr. 48, 645 (1940)

82. Strugger, S. — Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Zellen mit Hilfe der Akridinorange-Färbung
Dtsch. tierärztl. Wschr. 49, 525 (1941)

83. Strugger, S. — Neues über die Fluoreszenzfärbung toter und lebender Bakterien
Dtsch. tierärztl. Wschr. 50, 51 (1942)

84. Strugger, S. — Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen über das Eindringen des Prontosil solubile in lebenden Bakterien- und Hefezellen
Dtsch. tierärztl. Wschr. 50, 321 (1942)

85. Strugger, S. u. P. Hilbrich — Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Akridinorange-Färbung
Dtsch. tierärztl. Wschr. 50, 121 (1942)

86. Stübel, H. — Die Fluoreszenz tierischer Gewebe in ultraviolettem Licht
Pflügers Arch. Physiol. 142, 1 (1911)

87. Thomason, B.M., W.B. Cherry u. P.R. Edwards — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. VI. Identification of salmonellae in fecal specimens
J. Bact. 77, 478 (1959)

88. Thomason, B.M., M.D. Moody u. M. Goldman — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. II. Rapid detection of varying numbers of malleomyces pseudomallei in contaminated materials and infected animals
J. Bact. 72, 362 (1956)

89. Thomason, B.M., W.B. Cherry u. M.D. Moody — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. III. Antigenic analysis of salmonella typhosa by means of fluorescent antibody and agglutination reactions
J. Bact. 74, 525 (1957)

90. Tolle, A. — Die fluoreszenzserologische Diagnose der Rinderleukose
Dtsch. tierärztl. Wschr. 68, 193 (1961)

91. Traver, M.J., R.L. Northrop u. D.L. Walker — Site of intracellular antigen production by myxovirus. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 104, 268 (1960)

92. — Virus in human cancer cells in vivo. Virology 5, 395 (1958)

93. Vogel, R.A. u. J.F. Padula — Indirect staining reaction with fluorescent antibody for detection of antibodies to pathogenic fungi. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 98, 135 (1958)

94. Watson, B.K. — Distribution of mumps virus in tissue cultures as determined by fluorescent-labeled antiserum. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 79, 222 (1952)

95. Watson, B.K. — Fate of mumps virus in the embryonated egg as determined by specific staining with fluorescein-labeled immune serum. J. Exper. Med. 96, 653 (1952)

96. Weller, T.H. u. A.H. Coons — Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 86, 789 (1954)

97. Wels, P. — Der Einfluß kurzwelliger Strahlen auf die Fluoreszenz von Eiweißkörpern und ihren Spaltprodukten. Pflügers Arch. Physiol. 219, 5 (1928)

98. Wels, P. u. M. Jokisch — Der Einfluß der Quarzlampenbestrahlung auf die Fluoreszenz von Geweben und Zellen. Pflügers Arch. Physiol. 223, 369 (1930)

99. Wels, P. u. M. Jokisch — Weitere Untersuchungen über die Fluoreszenz bestrahlter Zellen. Pflügers Arch. Physiol. 228, 671 (1931)

100. White, R.G., A.H. Coons u. J.M. Connolly — Studies on antibody production. III. The alum granuloma. J. Exper. Med. 102, 73 (1955)

101. White, R.G., A.H. Coons u. J.M. Connolly — Studies on antibody production. IV. The role of a wax fraction of mycobacterium tuberculosis in adjuvant emulsions on the production of antibody to egg albumin. J. Exper. Med. 102, 83 (1955)

102. Wirth, D. u. J. Quereder — Blutuntersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Wien. tierärztl. Mschr. 33, 207 (1946)

Herrn Professor Dr. Hartwigk möchte ich dafür danken, daß er mir die Möglichkeit gab, in seinem Institut zu arbeiten.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Oberassistent Dr. Hellmann für die Überlassung des Themas und für die bei der Erstellung der Arbeit geleistete Hilfe.

Fräulein Tauscher danke ich für ihre stets gern gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

Am 18. Januar 1935 wurde ich als Sohn des Pfarrers Ernst-Heinrich Staak und seiner Ehefrau Marie-Luise geborene Karow in Brüssel geboren.

Von 1940 bis zur Rückkehr nach Deutschland im Jahre 1944 besuchte ich die dortige deutsche Grundschule. In Rostock, Mecklenburg, setzte ich die Grundschulausbildung von 1945 bis 1950 fort. Anschließend besuchte ich die Humboldt-Oberschule in Magdeburg, an der ich 1953 die Reifeprüfung bestand. Im gleichen Jahr siedelte ich nach Westberlin über und absolvierte das 13. Schuljahr an der Paulsen-Oberschule in Berlin-Steglitz.

Das Studium der Veterinärmedizin begann ich im Herbst 1954/55 an der Freien Universität Berlin. Hier bestand ich am 2. Oktober 1956 die tierärztliche Vorprüfung und am 7. März 1960 das tierärztliche Staatsexamen. Vom 1. März 1960 bis zum 31. Oktober 1961 war ich im Rahmen eines Forschungsauftrages am Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin tätig.

Photodruck der Photo Copie GmbH.